

ENGINEERING OF BIOMATERIALS

INŻYNIERIA BIOMATERIAŁÓW
CZASOPISMO POLSKIEGO STOWARZYSZENIA BIOMATERIAŁÓW
I WYDZIAŁU INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI AGH

Number 99-101

Numer 99-101

Volume XIII

Rok XIII

DECEMBER 2010

GRUDZIEŃ 2010

ISSN 1429-7248

PUBLISHER:

WYDAWCA:

**Polish Society
for Biomaterials
in Cracow**

Polskie
Stowarzyszenie
Biomateriałów
w Krakowie

**EDITORIAL
COMMITTEE:**

KOMITET
REDAKCYJNY:

Editor-in-Chief

Redaktor naczelny
Jan Chłopek

Editor

Redaktor
Elżbieta Pamuła

Secretary of editorial

Sekretarz redakcji

Design

Projekt
**Katarzyna Trała
Augustyn Powroźnik**

**ADDRESS OF
EDITORIAL OFFICE:**

ADRES REDAKCJI:

AGH-UST

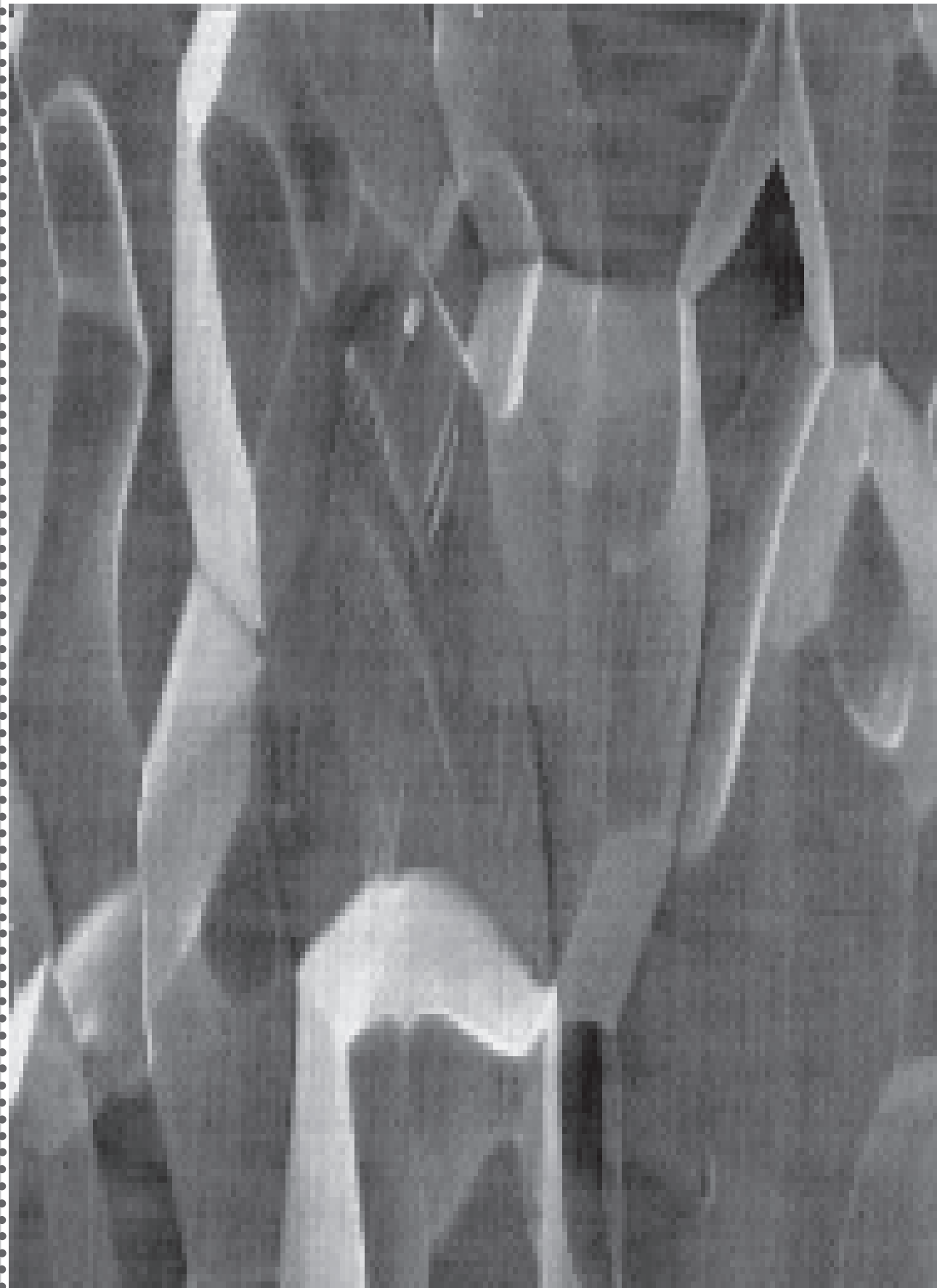
30/A3, Mickiewicz Av.
30-059 Cracow, Poland
Akademia
Górnictwo-Hutnicza
al. Mickiewicza 30/A-3
30-059 Kraków

Issue: 200 copies

Nakład: 200 egz.

**Scientific Publishing
House AKAPIT**

Wydawnictwo Naukowe
AKAPIT
e-mail: wn@akapit.krakow.pl



INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD
MIĘDZYNARODOWY KOMITET REDAKCYJNY

Iulian Antoniac

UNIVERSITY POLITEHNICA OF BUCHAREST, ROMANIA

Lucie Bacakova

ACADEMY OF SCIENCE OF THE CZECH REPUBLIC, PRAGUE, CZECH REPUBLIC

Romuald Będziński

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA / WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Marta Błażewicz

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

Stanisław Błażewicz

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

Maria Borczuch-Łączka

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

Wojciech Chrzanowski

UNIVERSITY OF SYDNEY, AUSTRALIA

Tadeusz Cieślik

ŚŁĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA

Jan Ryszard Dąbrowski

POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA / BIAŁYSTOK TECHNICAL UNIVERSITY

Andrzej Górecki

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Robert Hurt

BROWN UNIVERSITY, PROVIDENCE, USA

James Kirkpatrick

JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITY, MAINZ, GERMANY

Wojciech Maria Kuś

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Małgorzata Lewandowska-Szumieł

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Jan Marcinia

POLITECHNIKA ŚŁĄSKA / SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Sergey Mikhalovsky

UNIVERSITY OF BRIGHTON, UNITED KINGDOM

Stanisław Mitura

POLITECHNIKA ŁÓDZKA / TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ

Roman Pampuch

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

Stanisław Pielka

AKADEMIA MEDYCZNA WE WROCŁAWIU / WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY

Vehid Salih

UCL EASTMAN DENTAL INSTITUTE, UNITED KINGDOM

Jacek Składzień

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, COLLEGIUM MEDICUM, KRAKÓW / JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM, CRACOW

Andrei V. Stanishevsky

UNIVERSITY OF ALABAMA AT BIRMINGHAM, USA

Anna Ślósarczyk

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

Tadeusz Trzaska

AKADEMIA WYCHOWANIA FIZYCZNEGO, POZNAŃ / UNIVERSITY SCHOOL OF PHYSICAL EDUCATION, POZNAŃ

Dimitris Tsipas

ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI, GREECE

Wskazówki dla autorów

1. Prace do opublikowania w kwartalniku „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” przyjmowane będą wyłącznie z tłumaczeniem na język angielski. Obcojęzyczność obowiązuje tylko język angielski.
2. Wszystkie nadsyłane artykuły są recenzowane.
3. Materiały do druku prosimy przysyłać na adres e-mail: kabe@agh.edu.pl lub Augustyn.Powroznik@agh.edu.pl
4. Struktura artykułu:
 - TYTUŁ • Autorzy • Streszczenie (100-200 słów) • Słowa kluczowe • Wprowadzenie • Materiały i metody • Wyniki i dyskusja • Wnioski • Podziękowania • Piśmiennictwo
5. Materiały ilustracyjne powinny znajdować się poza tekstem w oddzielnych plikach. Rozdzielczość rysunków min. 300 dpi. Wszystkie rysunki i wykresy powinny być czarno-białe lub w odcieniach szarości i ponumerowane cyframi arabskimi. W tekście należy umieścić odnośniki do rysunków i tabel. W tabelach i na wykresach należy umieścić opisy polskie i angielskie. W dodatkowym dokumencie należy zamieścić spis tabel i rysunków (po polsku i angielsku).
6. Na końcu artykułu należy podać wykaz piśmiennictwa w kolejności cytowania w tekście i kolejno ponumerowany.
7. Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzenia do opracowań autorskich zmian terminologicznych, poprawek redakcyjnych, stylistycznych, w celu dostosowania artykułu do norm przyjętych w naszym czasopiśmie. Zmiany i uzupełnienia merytoryczne będą dokonywane w uzgodnieniu z autorem.
8. Opinia lub uwagi recenzenta będą przekazywane Autorowi do ustosunkowania się. Nie dostarczenie poprawionego artykułu w terminie oznacza rezygnację Autora z publikacji pracy w naszym czasopiśmie.
9. Za publikację artykułów redakcja nie płaci honorarium autorskiego.
10. Adres redakcji:

Czasopismo
„Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów”
Akademia Górniczo-Hutnicza im. St. Staszica
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
al. Mickiewicza 30/A-3, 30-059 Kraków

tel. (48 12) 617 25 03, 617 22 38
tel./fax: (48 12) 617 45 41
e-mail: chlopek@agh.edu.pl,
kabe@agh.edu.pl,
Augustyn.Powroznik@agh.edu.pl,
www.biomat.krakow.pl

Warunki prenumeraty

Zamówienie na prenumeratę prosimy przysyłać na adres:
apowroz@agh.edu.pl, tel/fax: (48 12) 617 45 41
Konto:
Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów
30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30/A-3
Bank Śląski S.A. O/Kraków,
nr rachunku 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001
Opłaty: Cena numeru 99-101 wynosi 80 PLN

Instructions for authors

1. Papers for publication in quarterly magazine „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” should be written in English.
2. All articles are reviewed.
3. Manuscripts should be submitted to Editor's Office by e-mail to kabe@agh.edu.pl, or Augustyn.Powroznik@agh.edu.pl
4. A manuscript should be organized in the following order:
 - TITLE • Authors and affiliations • Abstract (100-200 words) • Keywords (4-6) • Introduction • Materials and methods • Results and Discussions • Conclusions • Acknowledgements • References
5. Authors' full names and affiliations with postal addresses should be given. If authors have different affiliations use superscripts 1,2...
6. All illustrations, figures, tables, graphs etc. preferably in black and white or grey scale should be presented in separate electronic files (format .jpg, .gif, .tiff, .bmp) and not incorporated into the Word document. High-resolution figures are required for publication, at least 300 dpi. All figures must be numbered in the order in which they appear in the paper and captioned below. They should be referenced in the text. The captions of all figures should be submitted on a separate sheet.
7. References should be listed at the end of the article. Number the references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text.
8. Opinion or notes of reviewers will be transferred to the author. If the corrected article will not be supplied on time, it means that the author has resigned from publication of work in our magazine.
9. Editorial does not pay author honorarium for publication of article.
10. Papers will not be considered for publication until all the requirements will be fulfilled.
11. Manuscripts should be submitted for publication to:

Journal
„Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów”
AGH University of Science and Technology
Faculty of Materials Science and Ceramics
30/A-3, Mickiewicz Av., 30-059 Cracow, Poland

tel. (48 12) 617 25 03, 617 22 38
tel./fax: (48 12) 617 45 41
e-mail: chlopek@agh.edu.pl,
kabe@agh.edu.pl
Augustyn.Powroznik@agh.edu.pl
www.biomat.krakow.pl

Subscription terms

Subscription rates:
Cost of number 96-98: 80 PLN
Payment should be made to:
Polish Society for Biomaterials
30/A3, Mickiewicz Av.
30-059 Cracow, Poland
Bank Śląski S.A. O/Krakow
account no. 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

XXI Conference on BIOMATERIALS IN MEDICINE AND VETERINARY MEDICINE

13-16 October 2011

Hotel "Perla Poludnia", Rytro

<http://galaxy.uci.agh.edu.pl/~apowroz/biomat/>



SPIIS TREŚCI

BIOACTIVITY AND STABILITY STUDIES OF POM/HAP NANOCOMPOSITES K.PIELICHOWSKA, E.STODOLAK	1
INSIGHTS ON THE STUDY OF DEGRADABLE METALLIC IMPLANTS: IRRELEVANCE OF SIMPLE IMMERSION MODELS W.Y. IP, C.K.YUEN	2
CHARACTERISTICS OF THE MAXILLA BONE TISSUE REGENERATION WHEN POROUS GLASS-CERAMIC MATERIAL «BYOSSITAL» APPLIED IN COMPLEX WITH ACUPUNCTURE. EXPERIMENTAL CASE I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA, A.Z.BARMYTKAYA, CHUDAKOV O.P., BEZZUBIK S.D.	3
METHOD OF THE PYOINFLAMMATORY COMPLICA- TIONS PREVENTION IN TRAUMATIC INJURIES OF THE INFERIOR ALVEOLAR NERVE OF TOXIC GENESIS. EXPERIMENTAL CASE Y.M.KAZAKOVA, I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA, K.V.VILKITZKAYA	4
STUDY OF RESULTS OF MICROCRYSTALLIZA- TION INDICES CORRELATION IN DIFFERENT BIOLOGICAL FLUIDS. EXPERIMENTAL AND CLINICAL CASE I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA , F.L.GONTCHAR	6
MACROSCOPIC DESCRIPRION OF THE EXTRACTED ALVEOLAR SOCKET HEALING IMPLANTED WITH «BYOSSITAL - 11» AND «KAFAM» IN EXPERIMENT O.P.CHUDAKOV, A.I.PETCHURSKIY, I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA,	8
STRUCTURAL DISORDER OF TOOTH GERMS IN THE ANTENATAL PERIOD UNDER LOW DOSES IONIZING RADIATION EXPOSURE IN ACUTE EXPERIMENT N.N.CHESKO, H.A.BERLOV, I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA, F.L.GONTCHAR	9
INFLUENCE OF TECHNOLOGY PRODUCTION ON COMFORT USE OF NONWOVENS SURGICAL GOWNS J.GRZYBOWSKA-PIETRAS	11
ELECTROSPUN BIOMIMETIC RESORBABLE SCAFFOLD I.RAJZER, W.PIEKARCZYK, R.KWIATKOWSKI, W.BINIAŚ, J.JANICKI	13

*STRESZCZANE W APPLIED MECHANICS REVIEWS
ABSTRACTED IN APPLIED MECHANICS REVIEWS*

CONTENTS

BIOACTIVITY AND STABILITY STUDIES OF POM/HAP NANOCOMPOSITES K.PIELICHOWSKA, E.STODOLAK	1
INSIGHTS ON THE STUDY OF DEGRADABLE METALLIC IMPLANTS: IRRELEVANCE OF SIMPLE IMMERSION MODELS W.Y. IP, C.K.YUEN	2
CHARACTERISTICS OF THE MAXILLA BONE TISSUE REGENERATION WHEN POROUS GLASS-CERAMIC MATERIAL «BYOSSITAL» APPLIED IN COMPLEX WITH ACUPUNCTURE. EXPERIMENTAL CASE I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA, A.Z.BARMYTKAYA, CHUDAKOV O.P., BEZZUBIK S.D.	3
METHOD OF THE PYOINFLAMMATORY COMPLICA- TIONS PREVENTION IN TRAUMATIC INJURIES OF THE INFERIOR ALVEOLAR NERVE OF TOXIC GENESIS. EXPERIMENTAL CASE Y.M.KAZAKOVA, I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA, K.V.VILKITZKAYA	4
STUDY OF RESULTS OF MICROCRYSTALLIZA- TION INDICES CORRELATION IN DIFFERENT BIOLOGICAL FLUIDS. EXPERIMENTAL AND CLINICAL CASE I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA , F.L.GONTCHAR	6
MACROSCOPIC DESCRIPRION OF THE EXTRACTED ALVEOLAR SOCKET HEALING IMPLANTED WITH «BYOSSITAL - 11» AND «KAFAM» IN EXPERIMENT O.P.CHUDAKOV, A.I.PETCHURSKIY, I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA,	8
STRUCTURAL DISORDER OF TOOTH GERMS IN THE ANTENATAL PERIOD UNDER LOW DOSES IONIZING RADIATION EXPOSURE IN ACUTE EXPERIMENT N.N.CHESKO, H.A.BERLOV, I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA, F.L.GONTCHAR	9
INFLUENCE OF TECHNOLOGY PRODUCTION ON COMFORT USE OF NONWOVENS SURGICAL GOWNS J.GRZYBOWSKA-PIETRAS	11
ELECTROSPUN BIOMIMETIC RESORBABLE SCAFFOLD I.RAJZER, W.PIEKARCZYK, R.KWIATKOWSKI, W.BINIAŚ, J.JANICKI	13

*WYDANIE DOFINANSOWANE PRZEZ MINISTRA NAUKI
I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO
EDITION FINANCED BY THE MINISTER OF SCIENCE
AND HIGHER EDUCATION*

PILOTAŻOWE BADANIA KLINICZNE NAD EFEKTYWNOŚCIĄ ELASTYCZNEGO KOMPOZYTU OPARTEGO NA HAp DLA WYPEŁNIANIA UBYTKÓW KOSTNYCH	16
A.BELCARZ, G.GINALSKA, I.POLKOWSKA, A.PRZEKORA, A.ŚLÓSARCZYK, A.ZIMA, Z.PASZKIEWICZ	
ZMIANY POWIERZCHNI IMPLANTU METALOWEGO POKYTEGO POWŁOKĄ POLIMEROWĄ POD WPŁY- WEM KONTAKTU Z PŁYNEM FIZJOLOGICZNYM	18
M.CIEŚLIK, K.ENGVALL, J.PAN, A.KOTARBA	
AKTYWNOŚĆ PRZECIWBAKTERYJNA IN VITRO WYTWORZONYCH BIOSZKIEŁ ZAWIERAJĄCYCH SREBRO	21
L.CIOŁEK, J.KARAŚ, A.OLSZYNA, E.ZACZYŃSKA, A.CZARNY, B.ŻYWICKA	
BADANIE PRZESIAKALNOŚCI DLA KRWI USZCZELNIANYCH PROTEZ NACZYNIOWYCH	24
M.GAWLIKOWSK, K.GORKA, A.JAROSZ, R.KUSTOSZ, M.KOWALCZUK, G.ADAMUS	
OCENA OPORNOŚCI OSMOTYCZNEJ KRWINEK CZERWONYCH JAKO DODATKOWA METODA OCENY BIOZGODNOŚCI	26
BIOMATERIAŁÓW Z KRWIĄ A.JANUS, S.PIELKA	
BIOCERAMIKA OPARTA NA TiO₂–WŁAŚCIWOŚCI FIZYCZNE TWORZYW KOMPOZYTOWYCH TiO₂/HAp	29
S.MICHAŁOWSKI, Z.JAEGERMANN	
WPŁYW PASYWACJI NA ODPORNOŚĆ KOROZYJNĄ STOPU NiTi	32
M.KACZMAREK	
OCENA WIĄZANIA ANTYBIOTYKÓW FLUORO- CHINOLONOWYCH Z PROTEZĄ NACZYNIOWĄ	34
D.KOWALCZUK, G.GINALSKA, M.MIAZGA-KARSKA	
BIODEGRADOWALNE MATERIAŁY POLIMEROWE WYKORZYSTYWANE JAKO MATERIAŁY NA ELEMENTY STABILIZUJĄCE	38
S.KUCIEL, A.LIBER-KNEĆ, P.KUŹNIAR	
MIKROSTRUKTURA I WŁAŚCIWOŚCI NISKO- TARCIOWEJ NANOKOMPOZYTOWEJ POWŁOKI nc-TiC/a-C NA UTWARDZONYM TLENEM STOPIE Ti-6Al-7Nb	42
T.MOSKALEWICZ, B.WENDLER, S.ZIMOWSKI, A.CZYRSKA-FILEMONOWICZ	
OPTIMALIZACJA PROJEKTOWANIA SCAFFOLDU TYTANOWEGO PRZY UŻYCIU WNIOSEKOWANIA ROZMYTEGO	45
SYLWIA SOBIESZCZYK	
WPŁYW DOMIESZEK NA PROCESY STERYLI- ZACJI BIOSZKŁA MAŁYMI DAWKAMI PROMIE- NIOWANIA JONIZUJĄCEGO	47
S.SZARSKA, I.MALISZEWSKA, K.TUPICA	

PILOT CLINICAL STUDY OF EFFICACY OF FLEXIBLE HAP-BASED COMPOSITE FOR BONE DEFECTS REPLACEMENT	16
A.BELCARZ, G.GINALSKA, I.POLKOWSKA, A.PRZEKORA, A.ŚLÓSARCZYK, A.ZIMA, Z.PASZKIEWICZ	
CHANGES IN POLYMER COATED METAL IMPLANT SURFACE UPON CONTACT WITH BODY FLUID	18
M.CIEŚLIK, K.ENGVALL, J.PAN, A.KOTARBA	
IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SILVER-CONTAINING BIOGLASSES	21
L.CIOŁEK, J.KARAŚ, A.OLSZYNA, E.ZACZYŃSKA, A.CZARNY, B.ŻYWICKA	
INVESTIGATION OF BLOOD PERMEABILITY THROUGH SEALED VASCULAR PROSTHESIS	24
M.GAWLIKOWSK, K.GORKA, A.JAROSZ, R.KUSTOSZ, M.KOWALCZUK, G.ADAMUS	
EVALUATION OF RED BLOOD CELL OSMOTIC RESISTANCE AS AN ADDITIONAL METHOD FOR AS- SESSING THE BLOOD BIOCOMPATIBILITY OF BIOMATERIALS	26
A.JANUS, S.PIELKA	
TITANIA-BASED BIOCERAMICS–PHYSICAL PROPERTIES OF TiO₂/HAp COMPOSITE	29
S.MICHAŁOWSKI, Z.JAEGERMANN	
INFLUENCE OF PASSIVATION ON CORROSION RESISTANCE OF NITI ALLOY	32
M.KACZMAREK	
EVALUATION OF THE BINDING OF FLUORO- QUINOLONE ANTIBIOTICS TO THE VASCULAR PROSTHESIS	34
D.KOWALCZUK, G.GINALSKA, M.MIAZGA-KARSKA	
BIODEGRADABLE BIOPOLYMER MATERIALS FOR USING IN ORTHOPEDY AS A SPLINT MATERIAL	38
S.KUCIEL, A.LIBER-KNEĆ, P.KUŹNIAR	
MICROSTRUCTURE AND PROPERTIES OF LOW FRICTION NANOCOMPOSITE nc-TiC/a-C COATING ON Ti-6Al-7Nb ALLOY	42
T.MOSKALEWICZ, B.WENDLER, S.ZIMOWSKI, A.CZYRSKA-FILEMONOWICZ	
OPTIMALIZATION OF TITANIUM SCAFFOLD DESIGN USING FUZZY REASONING APPROACH	45
SYLWIA SOBIESZCZYK	
INFLUENCE OF DOPANTS ON STERILIZATION PROCESS OF BIOGLASS OF SMALL DOSE RADIATION	47
S.SZARSKA, I.MALISZEWSKA, K.TUPICA	

**ZASTOSOWANIE HYDROŻELI Z LUDZKIEJ
ALBUMINY JAKO POWŁOKI USZCZELNIAJĄCE
PROTEZY NACZYNIOWE 51**

A.SZULC, K.WALENKO, M.LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ, T.CIACH

**WŁAŚCIWOŚCI POWIERZCHNIOWE WYBRA-
NYCH MATERIAŁÓW CHITOZANOWYCH 53**

A.SIONKOWSKA, J.KOZŁOWSKA, A.PŁANECKA,
J.SKOPİŃSKA-WIŚNIEWSKA, P.ŁOŚ

**CHARAKTERYSTYKA PROWADNIKÓW
STOSOWANYCH W IMPLANTOWANIU
KARDIOSTYMULATORÓW SERCA 56**

J.PRZONDZIOŃ, R.MŁYNARSKI, J.SZALA, A.KUR

**DEGRADACJA IMPLANTÓW METALICZNYCH
POKRYTYCH SREBREM 58**

B.ŚWIECZKO-ŻUREK, A.PAŁUBICKA, M.BOGDAŃSKI,
M.KRZEMIŃSKI

**ODTWARZANIE WZORÓW POLIMEROWYCH
PRZEZ ADSORBUJĄCE BIAŁKA: ANALIZA
PORÓWNAWCZA OBRAZÓW AFM I OBRAZÓW
FLUORESCENCYJNYCH ZA POMOCĄ
GEOMETRII CAŁKOWEJ 61**

J.ZEMŁA, M.LEKKA, J.RACZKOWSKA, A.BERNASIK, J.RYSZ,
A.BUDKOWSKI

**WPLYW ŚRODOWISKA BAKTERYJNEGO
NA POWSTAWANIE BIOFILMU NA STOPIE
TYTANU – Ti-13Nb-13Zr 63**

J.ZORN, A.PAŁUBICKA

**OPRACOWANIE BIORESORBOWALNYCH
WIELOWARSTWOWYCH NOŚNIKÓW
POLIMEROWYCH DO KONTROLOWANEGO
UWALNIANIA DOKSORUBICYN 64**

K.STOKŁOSA, J.KASPERCZYK, P.DOBRZYŃSKI, A.SMOLA

**BIODEGRADOWALNY POLIMEROWY SYSTEM
UWALNIANIA RADIOUCZULACZA-
BADANIA IN VITRO 67**

A.BUSZMAN, J.KASPERCZYK, B.JARZĄBEK, K.STOKŁOSA,
A.SMOLA

**BADANIA MIKROTWARDOŚCI I MIKRO-
MORFOLOGII POWIERZCHNI EKSPERYMEN-
TALNYCH MATERIAŁÓW STOMATOLOGII
ODTWÓRCZEJ 72**

J.KARAŚ, K.SZAMAŁEK

**AUTOPRZESZCZEP WIÓR CHRZĘSTNO-
KOSTNYCH Z WYKORZYSTANIEM
KOLAGENOWEJ BŁONY ZAPOROWEJ –
BADANIA PILOTAŻOWE NAD GOJENIEM
UBYTKÓW CHRZĄSTKI STAWOWEJ 76**

E.KARUGA, B.ŻYWICKA, S.PIELKA

**WYBRANE WŁASNOŚCI BIOMECHANICZNE
PEEKOWEJ PROTEZY TRZONU TYPU
„FUSION” 80**

L.F.CIUPIK, A.KIERZKOWSKA, M.ŁOZOWSKI

**APPLICATION OF HYDROGELS COMPOSED
OF HUMAN SERUM ALBUMIN FOR DACRON
VASCULAR GRAFT SEALING 51**

A.SZULC, K.WALENKO, M.LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ, T.CIACH

**SURFACE PROPERTIES OF DIFFERENT
CHITOSAN MATERIALS 53**

A.SIONKOWSKA, J.KOZŁOWSKA, A.PŁANECKA,
J.SKOPİŃSKA-WIŚNIEWSKA, P.ŁOŚ

**CHARACTERISTICS OF LEADERS USED
IN HEART PACEMAKERS IMPLANTATION 56**

J.PRZONDZIOŃ, R.MŁYNARSKI, J.SZALA, A.KUR

**DEGRADATION OF METAL IMPLANTS
COVERED WITH SILVER 58**

B.ŚWIECZKO-ŻUREK, A.PAŁUBICKA, M.BOGDAŃSKI,
M.KRZEMIŃSKI

**POLYMER PATTERNS REPLICATED BY
ADSORBING PROTEINS: COMPARISON
OF AFM AND FLUORESCENCE IMAGES
WITH INTEGRAL GEOMETRY ANALYSIS 61**

J.ZEMŁA, M.LEKKA, J.RACZKOWSKA, A.BERNASIK, J.RYSZ,
A.BUDKOWSKI

**THE IMPACT OF BACTERIAL ENVIRONMENT
ON FORMATION OF BIOFILM ON THE TITANIUM
ALLOY – Ti-13Nb-13Zr 63**

J.ZORN, A.PAŁUBICKA

**ELABORATION OF BIORESORBABLE MULTI-
LAYERED POLYMERIC CARRIERS FOR
CONTROLLED DOXORUBICIN RELEASE 64**

K.STOKŁOSA, J.KASPERCZYK, P.DOBRZYŃSKI, A.SMOLA

**BODEGRADABLE POLYMERIC SYSTEM
RELEASING RADIOSENSITIZER- THE IN VITRO
STUDIES 67**

A.BUSZMAN, J.KASPERCZYK, B.JARZĄBEK, K.STOKŁOSA,
A.SMOLA

**STUDY ON SURFACE MICROHARDNESS
AND MICROMORPHOLOGY OF EXPERIMENTAL
RESTORATIVE FILLING MATERIALS 72**

J.KARAŚ, K.SZAMAŁEK

**AUTOTRANSPLANTATION OF CARTILAGE-
BONE CHIPS USING A COLLAGEN BARRIER
MEMBRANE - A PILOT STUDY OF CARTILAGE
DEFECTS HEALING 76**

E.KARUGA, B.ŻYWICKA, S.PIELKA

**SELECTED BIOMECHANICAL PROPERTIES
OF THE “FUSION” TYPE PEEK VERTEBRAL
BODY PROSTHESIS 80**

L.F.CIUPIK, A.KIERZKOWSKA, M.ŁOZOWSKI

OCENA HISTOLOGICZNA I ULTRA- STRUKTURALNA ŚCIAN TĘTNIĄKÓW AORTY BRZUSZNEJ

M.KOBIELARZ, K.MAKSYMOWICZ, K.KALETA, P.KUROPKA,
K.MARYCZ, R.BĘDZIŃSKI

83

INTELIĞENTNE OPATRUNKI NA TRUDNO GOJĄCE SIĘ RANY

A.PŁANECKA, A.SIONKOWSKA, B.PIETRZAK, W.SUJKA

88

ODPORNOŚĆ FOTOCHEMICZNA CHITOZANU W OBECNOŚCI DODATKÓW: KOLAGENU, GLUTATIONU, KAMFOROCHINONU, FENYLOALANINY ORAZ TYROZINY

A.SIONKOWSKA, A.PŁANECKA, J.KOZŁOWSKA, P.ŁOŚ,
J.SKUPIŃSKA-WIŚNIEWSKA

90

WPLYW PARAMETRÓW PROCESU PACVD NA BUDOWĘ I WŁAŚCIWOŚCI

SYNERGICZNYCH UKŁADÓW SiC_xNy(H)/Ti
J.KONEFAŁ, A.MAŁEK, S.KŁUSKA, S.JONAS, S.ZIMOWSKI

93

CHARAKTERYSTYKA USIECIOWANYCH BIOMATERIAŁÓW NA BAZIE KOLAGENU I ELASTYNY

J.SKOPINSKA-WISNIEWSKA, A.SIONKOWSKA, M.GAWRON,
J.KOZŁOWSKA, A.PŁANECKA

97

NANOCZĄSTKI O STRUKTURZE RDZEŃ- POWŁOKA DO ENKAPSULACJI

I TRANSPORTU PEPTYDÓW
B.ROBAK, P.WEDA, R.KOZAK, J.SILBERRING, B.TRZEBICKA,
A.DWORAK

100

WŁAŚCIWOŚCI TRIBOLOGICZNE SPIEKANYCH STOPÓW TYTANU DO ZASTOSOWAŃ BIOMEDYCZNYCH

P.DEPTUŁA

102

ENZYMATYCZNA MINERALIZACJA HYDROŻELÓW GLIKOLU KATECHOLO-POLYETYLENOWEGO (cPEG) W ZASTOSOWANIACH JAKO KOSTNY MATERIAŁ ZASTĘPCZY

T.E.L.DOUGLAS, P.B.MESSERSMITH, J.A.JANSEN,
S.C.G.LEEUWENBURGH

105

CYTOTOXICITY OF THE NEW BIODEGRADABLE POLYLACTIDE FIBRES FOR TISSUE REPAIR AND REGENERATION

B.ŻYWICKA, E.ZACZYŃSKA, A.CZARNY,
K.TWAROWSKA-SCHMIDT

107

ADHESION AND GROWTH OF VASCULAR CELLS ON POROUS POLYETHYLENE TEREPHTHALATE SCAFFOLDS

J.HAVLIKOVA, K.TUREK, G.DAJKO, L.BACAKOVA

108

FULLERENE-TITANIUM (C₆₀/Ti) COMPOSITES CAUSE NO DNA DAMAGE RESPONSE

IN HUMAN OSTEOBLAST-LIKE MG 63 CELLS
I.KOPOVA, L.BACAKOVA, J.VACIK, V.LAVRENTIEV

109

HISTOLOGICAL AND ULTRASTRUCTURAL EVALUATION OF THE WALLS OF ABDOMINAL AORTIC ANEURYSMS

M.KOBIELARZ, K.MAKSYMOWICZ, K.KALETA, P.KUROPKA,
K.MARYCZ, R.BĘDZIŃSKI

83

INTELLIGENT DRESSINGS ON CHRONIC WOUNDS

A.PŁANECKA, A.SIONKOWSKA, B.PIETRZAK, W.SUJKA

88

PHOTOCHEMICAL STABILITY OF CHITOSAN IN THE PRESENCE OF SMALL AMOUNT OF COLLAGEN, GLUTATHIONE, CAMPHORO- QUINONE, PHENYLALANINE AND TYROSINE

A.SIONKOWSKA, A.PŁANECKA, J.KOZŁOWSKA, P.ŁOŚ,
J.SKUPIŃSKA-WIŚNIEWSKA

90

INFLUENCE OF PACVD PARAMETERS ON STRUCTURE AND PROPERTIES OF SYNERGIC SiC_xNy(H)/Ti SYSTEM

J.KONEFAŁ, A.MAŁEK, S.KŁUSKA, S.JONAS, S.ZIMOWSKI

93

THE CHARACTERIZATION OF CROSS-LINKED COLLAGEN AND COLLAGEN/ELASTIN BASED BIOMATERIALS

J.SKOPINSKA-WISNIEWSKA, A.SIONKOWSKA, M.GAWRON,
J.KOZŁOWSKA, A.PŁANECKA

97

CORE-SHELL NANOPARTICLES FOR ENCAPSULATION AND TRANSPORT OF PEPTIDES

B.ROBAK, P.WEDA, R.KOZAK, J.SILBERRING, B.TRZEBICKA,
A.DWORAK

100

TRIBOLOGICAL PROPERTIES OF SINTERED TITANIUM ALLOYS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

P.DEPTUŁA

102

ENZYMATIC MINERALIZATION OF CATECHOL- POLYETHYLENE GLYCOL (cPEG) HYDROGELS FOR BONE REPLACEMENT APPLICATIONS

T.E.L.DOUGLAS, P.B.MESSERSMITH, J.A.JANSEN,
S.C.G.LEEUWENBURGH

105

CYTOTOXICITY OF THE NEW BIODEGRADABLE POLYLACTIDE FIBRES FOR TISSUE REPAIR AND REGENERATION

B.ŻYWICKA, E.ZACZYŃSKA, A.CZARNY,
K.TWAROWSKA-SCHMIDT

107

ADHESION AND GROWTH OF VASCULAR CELLS ON POROUS POLYETHYLENE TEREPHTHALATE SCAFFOLDS

J.HAVLIKOVA, K.TUREK, G.DAJKO, L.BACAKOVA

108

FULLERENE-TITANIUM (C₆₀/Ti) COMPOSITES CAUSE NO DNA DAMAGE RESPONSE

IN HUMAN OSTEOBLAST-LIKE MG 63 CELLS
I.KOPOVA, L.BACAKOVA, J.VACIK, V.LAVRENTIEV

109

BIOCOMPATIBILITY OF HYBRID FIBROUS MATERIALS BASING ON POLY-L/DL-LACTIDE 110

E.STODOLAK, A.SCIŚŁOWSKA-CZARNECKA, M.BŁAZEWICZ, M.BOGUN, T.MIKOŁAJCZYK, E.MENASZEK

POTENCJAŁY CIEPLNE INICJUJĄCE SIŁĘ LORENZA W BUDOWIE STRUKTUR PRZESTRZENNYCH O ZASTOSOWANIACH MEDYCZNYCH 111
M.WÓJCIK

WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNE POLILAKTYDU MODYFIKOWANEGO WŁÓKNAMI I CZĄSTKAMI PRZEZNACZONEGO NA GWOŹDZIE ŚRÓDSZPIKOWE 117
A.MORAWSKA-CHOCHÓŁ, J.CHŁOPEK, A.WIETECZA

POLYACRYLONITRILE PRECURSOR FIBRES CONTAINING BIOGLASS 121
G.SZPARAGA, P.KRÓL, M.BOGUŃ

ENHANCED CELL INTEGRATION TO TITANIUM -GRAFIT COMPOSITE 122
E.MENASZEK, A.ŚCIŚŁOWSKA-CZARNECKA, P.DEPTUŁA, J.R.DĄBROWSKI

TOMOGRAPHIC AND HISTOLOGICAL ASSESSMENT OF BONE REGENERATION IN THE EXPERIMENTAL DEFECTS IN RABBIT FEMORAL TROCHLEA TREATED WITH RESORBABLE SCAFFOLDS 123
E.PAMUŁA, E.MENASZEK, P.MALISZ, P.DOBRZYŃSKI, M.ORZELSKI, P.SILMANOWICZ

KOMPOZYT POLIMEROWO-CERAMICZNY JAKO POTENCJALNY IMPLANT KOSTNY 125
A.JELONEK, K.KILAN, A.SKÓRSKA-STANIA, B.OLEKSYN

VIBRATIONAL SPECTROSCOPY INVESTIGATION OF MONTMORILLONITE - CHITOSANE NANOCOMPOSITE MATERIALS 128
C.PALUSZKIEWICZ, E.STODOLAK

BIOCOMPATIBILITY OF HYBRID FIBROUS MATERIALS BASING ON POLY-L/DL-LACTIDE 110

E.STODOLAK, A.SCIŚŁOWSKA-CZARNECKA, M.BŁAZEWICZ, M.BOGUN, T.MIKOŁAJCZYK, E.MENASZEK

THERMAL POTENTIAL INITIATING LORENTZ'S FORCE IN FORMATION OF SPATIAL STRUCTURE FOR MEDICAL APPLICATION 111
M.WOJCIK

MECHANICAL PROPERTIES OF POLYLACTIDE MODIFIED WITH FIBRES AND PARTICLES FOR INTRAMEDULLARY NAILS 117
A.MORAWSKA-CHOCHÓŁ, J.CHŁOPEK, A.WIETECZA

POLYACRYLONITRILE PRECURSOR FIBRES CONTAINING BIOGLASS 121
G.SZPARAGA, P.KRÓL, M.BOGUŃ

ENHANCED CELL INTEGRATION TO TITANIUM -GRAFIT COMPOSITE 122
E.MENASZEK, A.ŚCIŚŁOWSKA-CZARNECKA, P.DEPTUŁA, J.R.DĄBROWSKI

TOMOGRAPHIC AND HISTOLOGICAL ASSESSMENT OF BONE REGENERATION IN THE EXPERIMENTAL DEFECTS IN RABBIT FEMORAL TROCHLEA TREATED WITH RESORBABLE SCAFFOLDS 123
E.PAMUŁA, E.MENASZEK, P.MALISZ, P.DOBRZYŃSKI, M.ORZELSKI, P.SILMANOWICZ

POLYMER-CERAMIC COMPOSITE AS A POTENTIAL BONE IMPLANT 125
A.JELONEK, K.KILAN, A.SKÓRSKA-STANIA, B.OLEKSYN

VIBRATIONAL SPECTROSCOPY INVESTIGATION OF MONTMORILLONITE - CHITOSANE NANOCOMPOSITE MATERIALS 128
C.PALUSZKIEWICZ, E.STODOLAK

BIOACTIVITY AND STABILITY STUDIES OF POM/HAp NANOCOMPOSITES

KINGA PIELICHOWSKA, EWA STODOLAK

AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND

[*Engineering of Biomaterials*, 99-101, (2010), 1-2]

Introduction

One of the most important groups of polymer-ceramics composites are polymer/hydroxyapatite materials. Extracellular matrix (ECM) of all bone tissue is essentially built by mineralised collagen fibrils, consisting of a collagen matrix reinforced with 50-60 wt. % of apatite crystals. HAp is the closest synthetic equivalent to human bone mineral and it exhibits excellent biocompatibility, bioactivity, bone bonding properties and osteoinduction, as shown by in vivo studies [1]. Due to the chemical similarity it facilitates the formation of new bone without resorption and interacts with the living system. If HAp is in a nanostructured form, the interaction with the lowest hierarchical levels of a bone's structure becomes even more intensive because of the material's high surface area and enhanced bioactivity.

Polyoxymethylene (POM) is an important engineering polymer consisting of main chains of repeating carbon-oxygen bonds in the form of oxymethylene units (OCH₂). Acetal homopolymer refers to resin containing solely the carbon-oxygen backbone, while for the copolymer resin the oxymethylene structure is occasionally interrupted by a comonomer unit [2]. Properties which arise from polyacetal structure are: high-impact strength, stiffness, resiliency, toughness and high yield stress; low friction coefficient; low gas and vapour permeability; exceptional dimensional stability and dielectric properties; high fatigue strength; and good retention of properties at elevated temperature [3]. POM shows an ultra high modulus – it is caused by the presence of extended-chain crystals, whereby a part of the polymer could still appear as chain-folded lamellae [4].

Experimental

A commercial grade of POM copolymer (Ultraform®) with melt flow rate (MFR 190/2.16, ISO 1133) 2.6 g/10 min, was supplied by BASF (Germany). Hydroxyapatite Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ nanopowder with a nanoparticle size below 100 nm (99% of particles) was product of nGimat Co. (Atlanta, USA). POM and POM/HAp nanocomposites (0, 0.5, 1.0, 2.5, 5 and 10.0% w/w of HAp) were prepared by melt processing method by using a double screw extruder (ThermoHaake PolyLab PTW 16/25). Compositions were shaped by injection moulding method using a DSM machine.

POM and POM/HAp nanocomposite specimens have been immersed in a simulated body fluid at 37°C for 3 and 7 days. After soaking, the specimens were removed from the SBF, gently rinsed with distilled water and dried [5]. After SBF immersion, the sample surface was examined by SEM-EDX method.

Moreover, POM and POM/10.0% HAp samples were incubated at the temperature of 70°C according to EN ISO 10993-13 during 41 weeks in the Ringer fluid, made by Baxter Terpol Sp. z o.o. (biological environment simulation) and distilled water. The pH, conductivity and the mass change

were measured during incubation.

Results and discussions

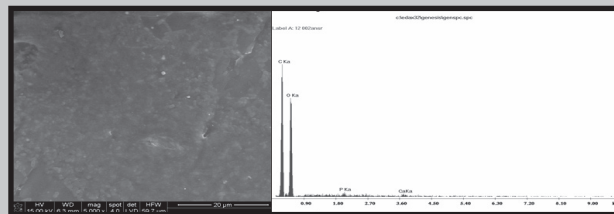


FIG.1. SEM microphotographs and EDX analysis after 7 days of incubation in SBF of POM/5.0% HAp

Bioactivity in vitro tests were performed in SBF and the results for POM/5% HAp nanocomposite are presented in FIG.1.

FIG.1 shows the surface morphology and results of average EDX analysis of POM/5.0% HAp after 7 days immersion. The obtained results show bioactivity of the investigated samples - formation of apatite layer on the surface of both samples does occur. The largest intensity of apatites peaks was observed for POM/5.0% HAp. In vitro stability of POM and POM/10.0% HAp samples was determined on the basis of pH variations of distilled water and Ringer solution and mass changes of the samples during the POM and POM nanocomposite incubation at the temperature 70°C for 41 weeks, (according to EN ISO 10933 – an accelerated degradation test as a screening method). Results are presented in FIG.2.

There is lack of significant pH changes of both water and Ringer solution during incubation of investigated samples, so in vitro behaviour between of POM and POM/10.0% HAp nanocomposite is quite similar. Moreover, mass of the samples remained practically the same after incubation. The obtained results, confirming very good in vitro stability of POM and POM/HAp nanocomposites, stay in good agreement with literature data available for pure POM [3].

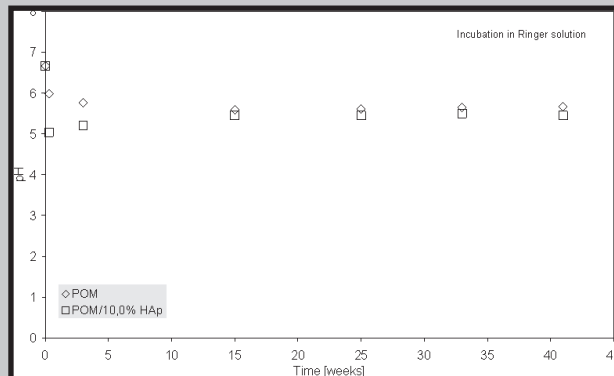


FIG.2. pH changes of distilled water and Ringer solution as a function of incubation time of POM and POM/10.0% HAp samples

Conclusions

The obtained results confirmed bioactivity of investigated POM/HAp nanocomposites; moreover, in vitro evaluation proves good POM and POM/HAp nanocomposites stability.

Acknowledgements

One of authors (KP) is grateful to the Polish Ministry of Science and Higher Education for financial support under the grant No. PBZ/MEiN/01/2006/15.

References

- [1]. Roeder RK, Converse GL, Kane RJ et al. Biol Mater Sci, 2008, 3, 38-45.
- [2]. Luftl S. et al. Polym Degrad Stab, 2006, 91, 464-471
- [3]. Masamoto J. Prog Polym Sci 1993, 18, 1-84.
- [4]. Pielichowski K, Flejtuch K. Polimery 2004, 49, 80-82.
- [5]. Kokubo T, Takadama H, Biomaterials, 2006, 27, 2907-2915.

INSIGHTS ON THE STUDY OF DEGRADABLE METALLIC IMPLANTS: IRRELEVANCE OF SIMPLE IMMERSION MODELS

W. Y. Ip^{1,2}, C. K. YUEN³

¹QUEEN MARY HOSPITAL,
DEPARTMENT OF ORTHOPAEDICS AND TRAUMATOLOGY,
5/F PROFESSIONAL BLOCK,
POKFULAM, HONG KONG

²THE UNIVERSITY OF HONG KONG,
DEPARTMENT OF ORTHOPAEDICS AND TRAUMATOLOGY,
9/F LABORATORY BLOCK,
23 SASSOON ROAD, POKFULAM, HONG KONG

³FORMERLY THE UNIVERSITY OF HONG KONG,
DEPARTMENT OF ORTHOPAEDICS AND TRAUMATOLOGY,
9/F LABORATORY BLOCK,
23 SASSOON ROAD, POKFULAM, HONG KONG;
MAILTO: H0128067@GRADUATE.HKU.HK

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 2-3]

Introduction

Immersion testing is a simple method for the corrosion testing of engineering materials, and quantifiable results can be achieved relatively easily and quickly. As a result, when the requisite instruments in an engineering laboratory are available, in vitro experimental data on corrosion

can be generated and published rapidly, and the reliability is seldom questioned so long as the external environment of the intended application can be simulated satisfactorily in the laboratory.

Similar immersion experiments were also observed for studies on degradable metallic implants made of magnesium-based alloys. However, despite the relatively wide usage of immersion testing, it might be ironic that the validity of such models on this class of material as a degradable implant biomaterial had not been formally verified. In contrast, the unrelatedness of immersion testing and in vivo results had been reported in journal with considerable impact factor [1]. With these concerns, the reliability and relevance of such data would warrant further investigation.

Methodology

We have conducted some animal experiments to assess the corrosion of degradable magnesium alloys in BALB/C mouse bodies. Animal licence was obtained from the Department of Health of the Hong Kong Government under Cap. 134, and ethical clearance was obtained from Committee on the Use of Live Animals in Teaching and Research (CULATR) of the University of Hong Kong. Magnesium-based alloys investigated include AM51A, AM60B, AZ91D and 99.95% pure magnesium, and were machined into cylindrical shape

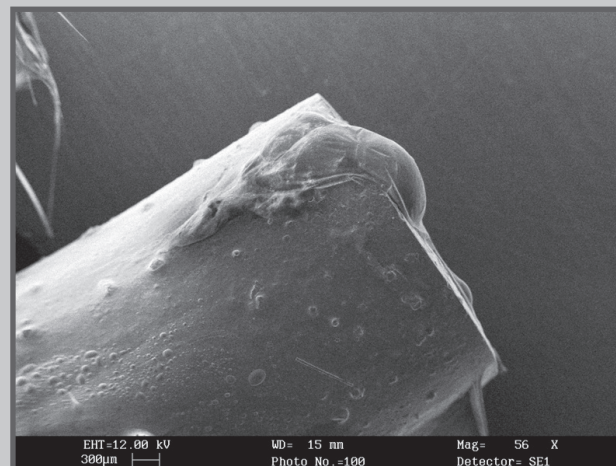


FIG.1. AZ91D retrieved after 6-month post-implantation, fibrous layer not removed.

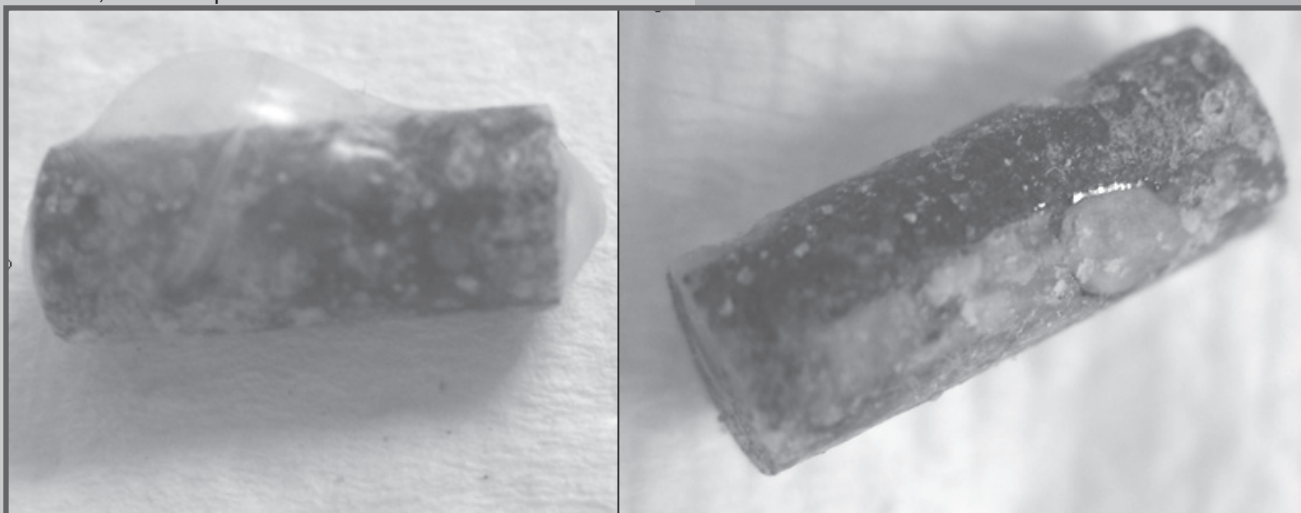


FIG.2.

Left: 99.95% Mg retrieved 6 months after implantation, fibrous layer not removed.

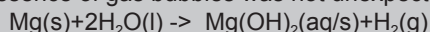
Right: Fibrous layer removed. Severe corrosion was observed at the position under gas bubble.

and polished to remove surface stress, and cleaned before implantation. Implantation was then performed subcutaneously above the mouse spine. Implants were retrieved after up to 6 months. Retrieved implants were observed directly and also under scanning electron microscope.

Result and discussion

No significant health effect was observed in the mice, except occasional diarrhoea (discussed elsewhere [2]). No pathological change could be observed at the site of implantation. When special attention was paid to the corroded alloy surface created by the implantation, however, interesting observations were found.

The presence of gas bubbles was not unexpected, as:



When magnesium alloys were carefully removed from the mouse body after subcutaneous implantation, the implants were found covered with fibrous tissues, and peri-implant gas bubbles were often observed when the implants were observed directly, while more micro-sized bubbles could be observed when the implant was placed inside the vacuum environment of a scanning electron microscope, indicating the presence of microscopic gas bubbles. For 99.95% magnesium which corroded much faster than other alloys, after the fibrous layer was removed, corrosion was clearly found to be much more severe under the gas bubbles (FIG.2).

Despite differential corrosion should indeed be anticipated when different parts of a piece of metal are in contact with differential environments, this knowledge was not discussed, or was indeed forgotten, by most investigators in this field of study. As indicated by our animal study, 6 months could be insufficient for the "gradual" dissolution to complete, at least in some applications. This study, which suggested that the presence of gas bubbles must be taken into account when considering the corrosion of degradable metallic implants, had therefore shed new insight into the field of study.

This blinding flash of the obvious was indeed an immediate invalidation of the current simple corrosion studies on this class of biomaterial. A single-phase immersion testing would simply be unable to simulate the differential environment on the alloy surface, covered by body fluid, fibrous tissue or other body tissues; plus the instantaneous or more persistent presence of gas bubble, unavoidably created by the corrosion of magnesium and trapped around the implant.

Conclusion

We have identified from pure magnesium samples that in vivo corrosion of degradable metallic implants could be much more rapid under the gas bubbles surrounding the implants. As an in vivo magnesium-based implant would unavoidably face a differential environment in the body with gas bubbles, it is highly suggestive that the relevance between the result of simple single-phase liquid immersion testing and the in vivo corrosion profile of degradable metallic implants cannot be high, because a simulation of the gas bubbles and surrounding fibrous tissues, which have significant effects on the corrosion profile, were simply lacking.

References

- [1] Witte F, Kaese V, Haferkamp H, et. al., *Biomaterials* 27-7, (2006), 1013-8.
- [2] Yuen CK, Ip WY., *Acta Biomaterialia*, 6-5, (2010), 1808-1812.

CHARACTERISTICS OF THE MAXILLA BONE TISSUE REGENERATION WHEN POROUS GLASS-CERAMIC MATERIAL «BYOSSITAL» APPLIED IN COMPLEX WITH ACUPUNCTURE. EXPERIMENTAL CASE

POHODENKO-CHUDAKOVA I.O.*, BARMYTZKAYA A.Z.,
CHUDAKOV O.P., BEZZUBIK S.D.

BELARUSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY,
BELARUSIAN COLLABORATING CENTER EACMFS,
9-1-63 KOSMONAVROV STR., PO Box 286, 220025 MINSK
REPUBLIC OF BELARUS

*MAILTO: ip-c@yandex.ru

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 3-4]

Introduction

Maxillofacial surgeons meet in every day practice the problem of the maxilla bone restoration after the tumors, tumor masses removal in traumatic injuries of the maxilla bones.

Information of the last two decades confirms that non-cancerous growth and maxilla cysts make 25 % of the total quantity of the surgical diseases. Immediate and late results of the treatment for patients with mentioned above diseases remain unsatisfactory up till now [1,2].

Application of different types of transplants for maxilla defects restoration is not every time possible for a maxillofacial surgeon and functional and aesthetic results are not satisfied sometimes. 10% of negative results of the implants technologies [4] application are due to the common resistance of the human body often determined by functional disorders of different levels of the homeostasis. Acupuncture potential attract attention of specialist more and more because it can provide required level of the human body homeostasis regulation and functioning autonomously, without any therapeutical stimulation from outside.

Aim of the work was to study the characteristics of the maxilla bone tissue regeneration when porous glass-ceramic material of «Byossital» applied with acupuncture in the experiment.

Materials and methods

We performed the examination on the 8 outbred dogs according to the «Regulations for the work with experimental animals» approved the MSMU Board on the 24.04.1996 and requirements regulating the experimental animals use. Standards of American Heart Association's «Guidelines for the Use of Animal in Reserch» и Guide for the care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press, Revised, 1996) [3,5] were used when invasive procedures were applied.

We cut the skin and tissues under it under the intravenous anesthesia in aseptic conditions. Then, perosteotomy was made with further bone tissue skeletonization in the region of the horizontal segment of the lower jaw where the injury of 20x15 mm was done. The neurovascular fascicle was

kept undamaged. The artificially made defect of the bone was filled in with the modeled implant in the form of block of «Byossital» material providing its firm adherence to the injury sides. The sutures were cleansed with 1% alcohol solution of iodine. Animals were treated with antibiotics of the piniciline group on the basis of 500 Units per one kg of the animal weight in order to provide the prophylaxis measures for pyoinflammatory complications.

The acupoint similar to the GI4 was irritated with the strong brake method every day during 10 days. Acupuncture needle exposure made 30–40 minutes.

In order to provide the materials sampling for histological examination, the experimental animals were removed from the experiment with thiopental OverDose according to the following terms: 14, 21, 28 days and 6 months. The macrospecimens were fixed in the 10% neutral formalin and they were decalcified by the nitric acid and placed into the paraffin. The mounts were stained with hematoxylin-eosin and by Van-Gison.

Results

The reclaim consisted of the specific young osteogenous tissue with formation of the bone tissue trabecules growing to the corner parts of the pores was formed by the 14 days around the inserted the implant.

21 days later, the specific osteogenous tissue surrounding the implant and separating its with taenias continues formation. The main weight of the specimen was lost during its processing with the nitric acid. Expressed regeneration of the bone tissue was fixed. Trabecular structures with directed growth to the implant side were formed. At the place of the dissolved parts of «Byossital» we fixed the free cavities, ingrowing girder of the bone tissue and surrounding free parts formed due to the dissolved implant had mature form.

By the 28 day the microscopic picture was similar than by the 21 day and osteogenic structures continues growing.

6 month later implanted materials had the form of small rounded conglomerates which were surrounded with new mature bone tissue. Interfaces with the injury were not found. At the same terms the regenerated bone tissue surrounding the implant had clear specific trabecular bone tissue structure. It was not possible to fix deep invasion of the bone tissue trabecules into the implant pores. But the much deeper invasion of the connecting fibers without signs of the osteogenesis was fixed.

The traces of the graft rejection (bone tissue necrosis, inflammation reaction, cells of the foreign body) were not fixed during all terms of examinations as from the side of the bone tissue as well as from the soft tissues surrounding the implant.

Conclusion

Described below glass-ceramic material «Byossital» that we applied for reconstruction of the bone tissue injuries has high level of the biocompatibility and its complex application with acupuncture provides adequate osteointegration with the bone tissue of the recipient. So, the offered complex of treatment becomes more perspective in restoration of the bone tissue defects of the maxilla.

References

- [1]. Bezrukov, V.M. Textbook for surgical stomatology and maxillofacial surgery / V.M. Bezrukov, T.G. Robustova. – M.: Medicine, 2000. – V. 2. – 488 p.
- [2]. Camelo, M. Periodontal regeneration with an autogenous bone-Bio-Oss composite graft and a Bio-Gide membrane / M. Camelo, M.L. Nevis // Int. J. Periodontics Restorative Den. – 2001. – Vol. 21, № 2. – P. 109-119.
- [3]. Denissov, S.D. Requirements for scientific experiment with animals / S.D. Denissov, T.S. Morozkina // Zdravoohranenie. – 2001. – № 4. – P. 40–42.
- [4]. Grybauskas, S. The use of hydroxiapatite granules and blocks in corrective and aesthetic jaw surgery / S. Grybauskas, G. Deryabin / Innovation approaches in practice for actual questions decisions of the modern maxillofacial surgery and stomatology: Rev. of works Repub. scient. Conf. With internat. participation «Parin's lectures 2010» (Minsk, 6 of May 2010 r.) / under red. I.O.Pohodenko-Chudakova, O.P.Chudakov, S.A.Kabanova et al. –Minsk: Pub. Center BSU, 2010. – P. 128.
- [5]. Materials of the Belarussian-British Meeting «Aesthetic questions for animals application in the teaching and scientific work» / under reduction of S.D.Denissov et al.]. –Minsk: MSMI, 1998. – 26 p.

METHOD OF THE PYOINFLAMMATORY COMPLICATIONS PREVENTION IN TRAUMATIC INJURIES OF THE INFERIOR ALVEOLAR NERVE OF TOXIC GENESIS. EXPERIMENTAL CASE

KAZAKOVA Y.M., POHODENKO-CHUDAKOVA I.O.*,
VILKITZKAYA K.V.

BELARUSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY,
BELARUSIAN COLLABORATING CENTER EACMFS, POLICLIN FOR
CHILDREN N 11
9-1-63 KOSSMONAVROV STR., PO Box 286, 220025 MINSK
REPUBLIC OF BELARUS
*MAILTO: ip-c@yandex.ru

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 4-6]

Introduction

It is obvious that the fractures of the lower jaw accompanied with injuries of the inferior alveolar nerve are complicated with osteomyelitis in most of cases [1]. According to the G.I. Sementchenko's theory (1958) pathogenesis of the maxilla osteomyelitis should be considered as neutrophilic process [5]. During long irritation of the peripheral nerves, the trophism of the bone tissue is deranged what provokes formation of the necrosis focuses. Furthermore, the pathological impulses come continuously in the cerebral cortex from the focuses of the permanent irritation of the

peripheral nerves. They provoke and support the vascular disorders of the maxilla in a reflex way due to which the trophism of the tissue is broken and make favorable conditions for infection processes development [3]. The problem of prophylaxis of complications after the endodontic treatment remains actual up till now (particularly, removal of the filling materials outside of the apical hole). But, it's to underline that endometazon is zincoxide-eugenol cement mixed with the paraformaldehyde and steroids which are often used for filling of the root canals.

The nerve tissue becomes imbued with the paraformaldehyde when contacting closely with the nerve trunk and it provokes coagulatory necrosis. When washing-out of the paraformaldehyde, infection agent gets into the tissue and expressed inflammatory reaction is developing which provokes osteomyelitis disease often [6].

Last decades, the acupuncture treatment became very known between doctors of different specialties and was scientifically based grounded or its wide use in the practical public health care and maxillofacial surgery as well [4]. Acupuncture treatment is effective, completely harmless, should be combined or can replace some therapeutical treatments.

Cited facts confirm that it is necessary to continue deeply examinations of acupuncture effects for prophylaxis of beginnings and development of pyoinflammatory diseases of the maxillofacial area.

Aim of work was to make comparative assessment of the pyoinflammatory complications quantity due to traumatic injuries of the inferior alveolar nerve of the toxic genesis experimentally when different treatment methods applied.

Materials and methods

The model of the toxic neuritis of the inferior alveolar nerve was made on the 25 rabbits of Shinshilla breed (males almost of the same weight).

Operations were performed under the intravenous anesthesia. When the lower jaw and mandibular canal were prepared for operation, the paste on basis of the paraformaldehyde for root canals filling was put into the perforated hole of the inferior alveolar nerve. The wound was sewed layer by layer and treated with 1% solution of the brilliant green.

All experimental animals had intramuscularly single injection of 500000 units of the benzylpenicillin for prophylaxis of the pyoinflammatory complications development.

Animals were divided in two groups. Group I (15 animals) had antibacterial therapy only. Animals of the group II (10 animals) had antibacterial therapy combined with acupuncture. The acupoint similar to the GI4 was irritated with the acupuncture needle № 5 with the first variant of the breaking method. Exposure period made 40 minutes and the treatment course consisted of 10 sessions performed every day. Acupoint localization was determined according to the special literature [2].

We performed the experimental animals examination and the state of the postoperative wounds in dynamics, the materials sampling for pathomorphological examinations was made 3, 7, 14, 21 days after operation and 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6 months later.

Results

Animals of the group I had pyoinflammatory complications as osteomyelitis of the lower jaw complicated with abscess of the submental region. These pathomorphological processes were developing 1.5 months and later what corresponds to the terms of the chronic osteomyelitis development according



FIG.1. Chronic osteomyelitis of the lower jaw with subperiosteal abscess. Term of examination - 1,5 months.

to the special literature [3].

Osteomyelitis of the lower jaw developed for 40% of the I group animals during the 1.5, 3, 4, 5, 6 months. Clinically, at the place of the access to the canal of the inferior alveolar nerve and the filling material injection on basis of paraformaldehyde, cuff thickening of the lower jaw was determined and had dimensions 0,5x0,7 cm - 1,0x2,0 cm, subperiosteal abscess was formed. The focus of destruction was separated by dense connective tissue capsule (FIG.1). The content of the subperiosteal abscess – white pus with bad smell. Inferior alveolar nerve was closely connected with the bone tissue and was difficult for determination. The structure of the bone at the place of trauma was considerably disturbed and changed. Mandibular bone was fragile at the place of the focus of trauma.

Animals of the group I had abscesses formation in 33,3% of cases during the terms of examination 1,5, 2,5, 3, 6 months. The pyoinflammatory focus was located in the mental area by the middle line and its diameter made 3 cm, the well formed tissue-connective capsule. The abscess content was presented by the purulent effluent of white color of bad smell. One rabbit had the abscess broken spontaneous and a fistula was formed at 5 month of examination.

The animals of the group II had no complications. The defect of the bone tissue was replaced by the bone tissue at the place of the trauma and there was no signs of the osteomyelitis. The filling material was resolved partially. There was no a cuff thickness of the mandible at the place of trauma and the periosteum cicatricially changed and connected with the bone was found only at the place of operation. These changes had the local signs only, the thickness was 0,3-0,5 cm and no purulent exudation found (FIG.2).



FIG.2. Thickened cicatricial-changed periosteum find out in the postoperative area only. Term of examination - 1,5 months.

Conclusion

Acupuncture application postoperatively for the animals of traumatic neuritis of the trigeminal nerve of the toxic genesis contributes to the significantly reduction of pyoinflammatory complications. This fact is the base to continue the experimental and clinical examinations of this kind and elaboration of the new methods of postoperative treatment of patients with toxic injuries of the inferior alveolar nerve during which the acupuncture should be considered not only as the treatment method but the prophylaxis one as well.

References

- [1] Kabakov B.D.: Fractures of maxilla / Kabakov B.D., Malyshev V.A., M.:Medicina, (1981), 85-94.
- [2] Kazaeev G.V.: Functional power informational system of the animal organism / Kazaeev G.V. // Vet. pathology, 4, (2003), 97-110.
- [3] Lukyanenko V.I.: Osteomyelitis of maxilla / Lukyanenko V.I. 2nd edit. corr. and compl. - L.:Medicina, (1986), 186.
- [4] Pohodenko-Chudakova I.O.: Comparative assessment of complex treatment methods of traumatic neuritis of the inferior alveolar nerve according to the pathologic examinations / Pohodenko-Chudakova I.O., Nedzvedz M.K., Avdeeva E.A., // Modern stomatology, 3-4, (2009), 63-65.
- [5] Semetchenko G.I.: Role of the nerve system in pathogenesis of the odontogenic osteomyelitis of mandible / Semetchenko G.I. // Doctor's affair, 4, (1958), 41-43.
- [6] Solomonov M.: Conservative approach for rehabilitation of before edodontically treated teeth / Solomonov M. // endodontology today, (2005), 3-8.

STUDY OF RESULTS OF MICROCRYSTALLIZATION INDICES CORRELATION IN DIFFERENT BIOLOGICAL FLUIDS. EXPERIMENTAL AND CLINICAL CASE

POHODENKO-CHUDAKOVA I.O.*, GONTCHAR F.L.

BELARUSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY,
BELARUSIAN COLLABORATING CENTER EACMFS, POLICLIN FOR
CHILDREN N 11
9-1-63 KOSSMONAVROV STR., PO Box 286, 220025 MINSK
REPUBLIC OF BELARUS
*MAILTO: ip-c@yandex.ru

[*Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 6-7*]

Introduction

One of the new methods of diagnostics and prognostication of our days is the functional morphology of the biological fluids. [1,2,3]. It is based on the analysis of the morphological picture of crystal and amorphous structures in the dehydrated biological fluids (BF). Phase change of BF into the solid state gives possibilities to fix molecular correlation in this difficult system and make their examination easier [5].

Totally, this method allows not only to evaluate effectiveness of performed prophylaxis, treatment and rehabilitation procedures but to prognosticate pathological processes and possibilities of their development [4].

But, there is no objective proofs for correlation of microcrystallization data of different biological fluids of the serum of blood (SB), oral fluid (OF), urine and exudation of the wounds for the experimental animals and SB, oral fluid and urine for men.

Aim of work was to make scientific bases for the oral fluid microcrystallization as the common indices of the human body homeostasis according to the comparative assessment of the microcrystallization data of the biological fluids for experimental animals and people.

Materials and methods

We examined 10 experimental animals of rabbits males of Shinshilla breed of the same weight and age and 10 persons (males) at the age of 18-25 years old. We depilated the back skin 2,5x2,5 cm of area and made the cut 1,5 cm of length under the local anesthesia. We cut the skin, under skin cellular tissue till the fascia and then we made 3 interrupted sutures with vicril 3/0. the wound was treated with 1% Solution brilliant green.

Three biological fluids (serum of blood, oral fluid, urine, wound exudation) were examined for microcrystallization for all patients. These biological fluids were taken at the same time of the day and for every animal and people.

Blood sampling was taken from the elbow veins of the people and marginal elbow of the ear of the animals. Than it was separated for serum and pellet fraction during the centrifugation within 10 minutes by 3000 turns/min. The oral fluid sampling was made with microdispenser from the oral cavity directly. The urine was placed into the sterile test-tubes. The wound exudation was taken during the experiment with the sterile eye pipette passing between the sutures deep into the wound. All biological fluids were put on the object-plate with the pipette doser by three drops, each volume was 0,01 ml. The samples of the biological fluids were dried under the room temperature in horizontal state than they were examined with the stereoscopic microscope. We took for examination the drops which microcrystallization picture was met more than two times.

The first type of microcrystallization was presented by the elongated of prismatic form crystalline structure, with radial orientation more often. The second type looked like isothermally placed crystals without clear orientation. Third type was presented by small isolated, single and non-aligned crystals.

We have analyzed 210 samples of biological fluids during this examination what corresponds to 70% of the total quantity of samples.

Results

During the examination we did not identified the I type of crystal organization according to the results of the serum of blood samples examination. II type was identified in 30% of cases and the III type was found in 70%.

Oral fluid indices confirmed that the I type of microcrystallization was found in 10% of examinations, II type – in 50% and the III type – in 40% of the people that we examined.

Results of the graining in urine confirmed that the I type was not found, II type was fixed for 40% of the experimental animals, III type – for 60%.

Microcrystallization indices of the postoperative wounds exudation did not showed organization of crystals, the II type

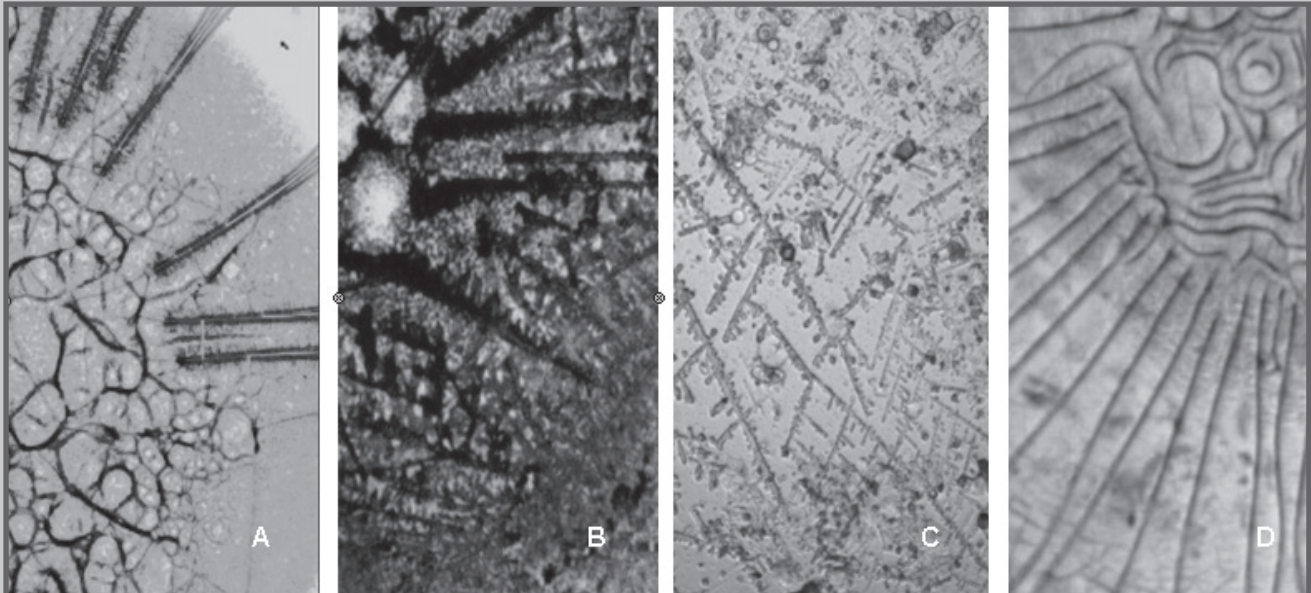


FIG.1. Results of the biological fluids study for the experimental animal No 2: a) serum of blood – II type of microcrystallization, b) oral fluid - II type of microcrystallization, c) urine - II type of microcrystallization, d) wound exudation - II type of microcrystallization.

was determined in 30% and the III type – in 70%. Picture No 1 contains results of the biological fluids examination of the experimental animal No 2 (FIG.1).

The reproducibility of the microcrystallization indices in experiment made 70%.

In the clinic, the I type of the crystals organization was found in 10% of the examined persons according to the serum of blood indices, II type – in 60%, III type – in 30%.

Results of the oral fluid and the urine were similar, I type of microcrystallization was found in 20% of examined persons, II type – in 50%, III type – in 30%. The reproducibility of this indice made 90%.

Conclusion

Taking into consideration the high percentage of correspondence of the of crystal organization in all examined biological fluids, as experimental animals as well as persons, we conclude that microcrystallization of the oral fluid is a common indices of the of the organism homeostasis which should be used for effectiveness evaluation of prophylaxis, treatment and rehabilitation procedures and prediction of a disease development. But special indices for every nosology needs to be elaborated and systematized in details as well as known methods of qualitative and quantitative appreciation of crystals need to be perfected on base of new technologies what is the subject of our further examinations.

References

- [1]. Alekseeva, O.P. Crystallography of saliva – new non-invasive method of infection diagnostic H. pylori / O.P.Alekseeva, A.V. Vorobjev// *Nizhgorodskiy med. journal.* – 2003. - № 2. – P. 73-77.
- [2]. Kazakova, Y.M. Changes of microcrystallization of the oral fluid for patients with pyoinflammatory diseases of maxillofacial area during standard treatment / Y.M. Kazakova // *Works of young scient. 2005: Coll. Of scient. works/ BSMU; by S.L. Kabak.* –Minsk, 2005. – P. 59-63.
- [3]. Kravetz, O.N. Chemiluminescence of the oral fluid in inflammatory diseases of periodontium/ O.N. Kravetz, R.R. Farhutdinov, H.M. Shajdullina // *Materials of national scient.-pract. conf. with intern. particip «Free radical, antioxidants and human diseases».* –Smolensk, 2001. – P. 226-228.
- [4]. Pohodenko-Chudakova, I.O. Prognostication of osteomyelitis development for patients with traumatic fractures of the lower jaw by microcrystallization of the oral fluid / I.O. Pohodenko-Chudakova, Y.M. Kazakova // *Bull.intern.scient. Association (Bulletin of the International Scientific Surgical Association). New technologies in medicine* – 2006. – V. 1, № 2. – P. 51-52.
- [5]. Shatohina, S.N. Functional morphology of biological fluids – new branch in clinical laboratory diagnostic / S.N. Shatohina// *Anthol. of clinical medicine.* – 2008. - № 18. – P. 50-56.

MACROSCOPIC DESCRIPTION OF THE EXTRACTED ALVEOLAR SOCKET HEALING IMPLANTED WITH «BYOSSITAL - 11» AND «KAFAM» IN EXPERIMENT

O.P.CHUDAKOV, A.I.PETCHURSKIY, I.O.POHODENKO-CHUDAKOVA

BELARUSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY,
BELARUSIAN COLLABORATING CENTER EACMFS, POLICLIN FOR
CHILDREN N 11
9-1-63 KOSSMONAVROV STR., PO Box 286, 220025 MINSK
REPUBLIC OF BELARUS
*MAILTO: ip-c@yandex.ru

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 8-9]

Introduction

Search of possibilities of the optimal conditions formation for predictable regeneration of the bone tissue of maxilla at the region of operation is an actual problem of the modern maxillofacial surgery [4].

Its decision should follow by two ways: elaboration and introduction of new materials stimulating osteogenesis at the region of the bone tissue defect of the maxilla [1, 2] and acupuncture application for the osteogenesis at the region of defects of maxilla with implanted into them effective substitutes of the autogenous bone graft. In spite of the fact that the process of the bone tissue formation is considered as determinate reaction of the organism [4], its activation remains a non-resolved problem up till now.

Complex approach to this problem solution should include two aspects of scientific examinations: experimental and clinical which give opportunity to make objective conclusions about positive processes of the osteogenesis and its application in clinics for raising of the patients treatment quality.

Aim of the work was to study macroscopic description of the extracted alveolar socket healing implanted with «Byossital - 11» and «Kafam» in experiment.

Materials and methods

Experimental examinations were performed on rabbits of the Shinshilla breed with weight $2,0 \pm 0,4$ kgs.

We performed the examination on the 8 outbred dogs according to the «Regulations for the work with experimental animals» approved the MSMU Board on the 24.04.1996 and requirements regulating the experimental animals use. Standards of American Heart Association's «Guidelines for the Use of Animal in Reserch» и Guide for the care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press, Revised, 1996) [3, 5] were used when invasive procedures were applied.

Method of the experiment

The gum was separated at the region of the incisor teeth under intravenous anaesthesia and local anesthesia with sol.novocaini 2%-2 ml than the teeth was extracted and bone edges were planed by conical dental cutter. The tooth hole was treated with 3% Solution of hydrogen peroxide, 0,05% Solution of chlorhexidine gluconate. The wounds of all animals were treated with antibiotics of large action spectrum. The tooth hole was filled in by the blood clot

mixed with powder of 0,5% lincomycin at the first run (9 animals), by «Byossital-11» at the second run (9 animals), by «Kafam» at the third run. Wounds after operation were sewed up with «Etikon 000». Experiment was performed with animals of II and III runs and the I run was the control one. Clinical observation (macroscopic description of the tooth hole healing) of all animals was made 7, 14, 21 days and 1, 6 months after the operation.

Results

Animals of the I group had feebly marked edema of the mucous tunic of the alveolar appendix of the lower jaw at the region of the sew up teeth hole 7 days after the operation. Animals of the II and III groups had no inflammation edema of the mucous tunic of the alveolar appendix and holes of extracted tooth. The sutures were of good state, after operation wounds closed up with the primary intention for these animals. A partial clot was found at the I run when bone tissue holes skeletonization. Small pieces of the bone tissue and dentine of the extracted teeth were found on the edges of the teeth wound. The tooth hole was filled in by the granulation tissue by 1/3. Animals of the groups I and III had the tooth holes filled in by the granulation tissue over the «Byossital – 11» and «Kafam». Sections of the granulated material of those implants alternated with sections of the granulated tissue often.

Animals of the group I had the mucous tunic of pink color at the region of the extracted tooth holes and the infiltration edema was moderated. Animals of the groups II and III had the mucous tunic of pink color at the region of the extracted tooth holes without visible edema of surrounding soft tissues and signs of fistula formation. During the skeletonization of the teeth holes of the I group animals the rests grumes looked well fragmentated. Granulations of «Byossital – 11» and «Kafam» looked like conglomerate ball alternating with formatting granulation tissue for the animals of the II and III groups. Implantation granulation «Kafam» for some animals of the group III looked like big separated and compact forms of fragments which border upon the edges of the alveolus of the extrated tooth.

21 days after the operation the mucous tunic at the region of the extracted tooth and surrounding of the mucous tunic of alveolar appendix of the lower jaw for animals of the group I had no signs of inflammation and fistula. Afteroperation scars were tender and completely epithelized or animals of the groups II and III. When skeletonizing the extracted teeth holes, pieces of the granulations «Byossital – 11» and «Kafam» looked smaller comparing with results of the previous terms, separated by bands of the yang bone tissue reclaim of gray color.

30 days after the operation the animals of the group I had the mucous tunic of the alveolar appendix of physiological color without edema and fistula. Considerable reduction of the alveolar appendixes height at the region of the extracted tooth of the lower jaw was fixed visually. Animals of the groups II and III had no edema of the mucous tunic of the alveolar appendix of the lower jaw and fistula 30 days later. Skeletonization of the alveolar appendix demonstrated that holes looked like solid fiber tissue, granulation of «Byossital – 11» and «Kafam» were not found and destruction of the holes of those groups of animals was not also confirmed macroscopically. The height of the alveolar appendix kept at the physiological level for all animals.

180 days after the operation during the skeletonization of the extracted tooth holes of the lower jaw of the I group of animals, complete change of the defect of the bone of alveolar appendix was not fixed. The defect of the hole was

replaced by crude connective tissue macroscopically. The focuses of the periosteous reaction as a nonconsiderable bone deformation were fixed on the vestibular and tongue surface. The height of the alveolar appendix was considerably reduced in these regions. Animals of the groups II and III had the mucous tunic of the alveolar appendix of the lower jaw at the region of the extracted tooth holes filled in with the granulations of «Byossital – 11» and «Kafam» of the pink color, no inflammation, fistula and deformations found. The height of the alveolar appendix kept the physiological level and without signs atrophy. Skeletonization of the parts of the holes macroscopically demonstrated there complete filling in with regenerated mosaic bone structure.

Conclusion

It's obviously clear that macroscopic clinical control for the process of the extracted tooth holes recovery in experiment demonstrated advantages of implantation with «Byossital – 11» and «Kafam». We continue examinations of this kind.

References

- [1] T.M. Ulyanova [et al.] :Application of the new bone-replaeng material «Katam» in stomatology// Engeneering of biomaterials. Cracow, (2004), 12-13.
- [2] O.P. Chudakov [et al.]: Biosetall and its forms in maxilla-facial surgery / XVII Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-facial Surgery, Tours, (2004), 167.
- [3] Denissov, S.D. Requirements for scientific experiment with animals / S.D. Denissov, T.S. Morozkina // Zdravoohranenie 4, (2001), 40–42.
- [4] Henitch L. Bioceramics: from idea to the clinic. Clinical implantology and stomatology, 4, (1998), 98-105.
- [5] Materials of the Belarussian-British Meeting «Aesthetic questions for animals application in the techering and scientific work» / under reduction of S.D.Denissov [et al.], Minsk: MSMI, (1998), 26.

STRUCTURAL DISORDER OF TOOTH GERMS IN THE ANTENATAL PERIOD UNDER LOW DOSES IONIZING RADIATION EXPOSURE IN ACUTE EXPERIMENT

CHESHKO N.N., BERLOV H.A., POHODENKO-CHUDAKOVA I.O.*, GONTCHAR F.L.

BELARUSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY,
BELARUSIAN COLLABORATING CENTER EACMFS, POLICLIN FOR
CHILDREN N 11
9-1-63 KOSSMONAVROV STR., PO Box 286, 220025 MINSK
REPUBLIC OF BELARUS
*MAILTO: ip-c@yandex.ru

[*Engineering of Biomaterials*, 99-101, (2010), 9-10]

Introduction

The study of ionizing radiation influence on dental system was begun with the assessment of large doses exposure during radiation therapy. Investigations of oral cavity radiolesions in general radiation exposure in low and mean doses

are not numerous [1, 2].

The aim of this work is to study odontogenesis in 20-day old animals' fetuses after a single exposure to low doses ionizing radiation.

Materials and methods

The experiment was carried out on 4-month old albino rats of mongrel gregarious breeding with initial body weight of 0,16 – 0,18 kg. Pregnant rats were exposed to external acute γ -radiation on «IGUR-1» unit (the radiation source – Cs-137, dose rate – $1,033 \times 10^{-3}$ Gy/sec) in 0,5 Gy dose on the 15th gestation day. The animals were kept at vivarium conditions. Tooth germs of rats' 20-day old fetuses were studied histologically.

Results

«Finger-shaped» tooth buds inherent to the period of tooth germ anlage and formation were still seen in the experimental animals. Thin epithelial necks connecting dental lamina with enamel organs were present. The enamel organs were large, well-formed, scyphiform, as those in the control group. But there were significant abnormalities among them. Thus, some enamel organs had poorly marked pulp. Thin outer enamel epithelium consisted of one-two condensed cell layers and disappeared at blood vessels entering it superficially (FIG.1). Such «spreading» of the enamel organ was explained by further proliferation of the cells of the focal thickening of the inner enamel epithelium, which partially replaced the outer enamel epithelium. Also there was some displacement of the enamel organ pulp. On serial sections we could observe that mesenchymal cells separated this considerable segment from the main mass of the enamel organ, so the latter took a smoother form (FIG.2).

Single giant dentinal papillae occurred more frequently, two or three of them in one tooth germ being rarer. The growth of three papillae was likely to result in the atrophy and death of the tooth germ. There were no such giant dentinal papillae in the control group.

Germs with short neck and two dentinal papillae of irregular size were especially deformed. The larger one, sagittally sectioned, was surrounded by a thick layer of the inner enamel epithelium (FIG.3). In other enamel organs with long epithelial neck the pulp was well-developed, while the dentinal papilla invaginated into the enamel organ through a small defect in its wall.

In the enamel organ, into which three dentinal papillae ingrew, the inner enamel epithelium was unevenly thickened, being more considerable in size on the apex of the medial one. Its cells infiltrated the enamel organ pulp and disappeared in it. Sometimes such a proliferation of the inner enamel epithelium cells occurred asymmetrically in one of its margins.

There were sharply abnormal structures that are sort of growing from the long neck of the underdeveloped enamel organ. Though the latter looked like scyphiform, the inner enamel epithelium was noted only on its one half. Extensive proliferation from the epithelial neck had a solid structure and consisted of fusiform cells. These structures are likely to be the second enamel organ on the common neck. In some abnormal tooth germs dentinal papillae ingrew into the enamel organs and partly destroyed both the outer and inner enamel epithelium. In some tooth germs the transition of the neck epithelium into the outer enamel epithelium was still evident, while the differentiation of such structures as the enamel organ pulp, inner enamel epithelium, basement

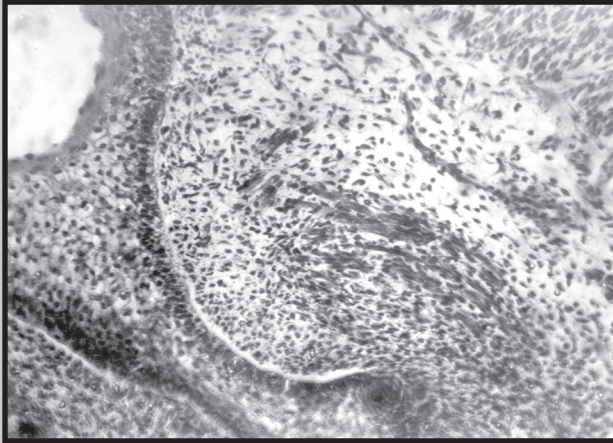


FIG.1. Thin layer of the outer enamel epithelium. Experiment 2/71. Staining with hematoxylin and eosin. x90.

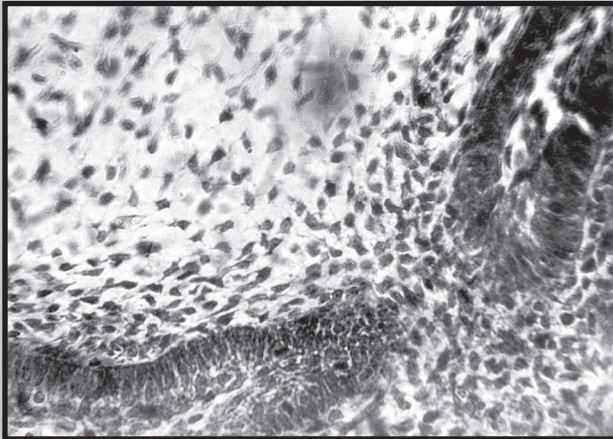


FIG.2. «Amputation» of the enamel organ segment by mesenchymal cells. Experiment 2/78. Staining with hematoxylin and eosin. x200.

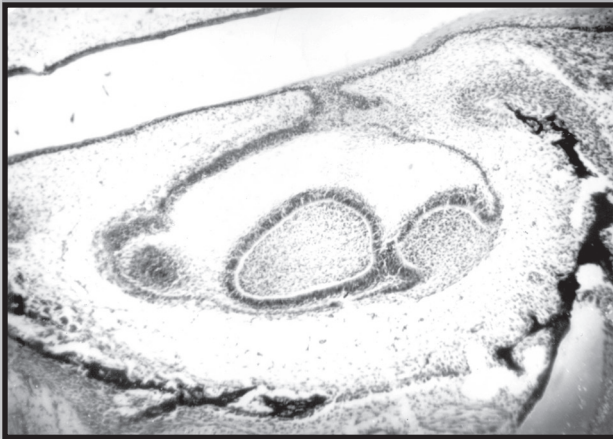


FIG.3. The enamel organ with two dental papillae of uneven size and thickened short neck. Experiment 2/78. Staining with hematoxylin and eosin. x90.

membrane and dental papilla had gone far beyond (Fig.4). Small enamel organs without clear differentiation of the enamel epithelium into the outer and inner one were present simultaneously with well-developed tooth germs.

Atrophic changes occurred simultaneously with hyperplastic processes in the same tooth germs. The enamel organ neck became thin and was infiltrated by mesenchymal cells, which, in some areas, partially destroyed the outer and inner enamel epithelium. In other areas the outer and inner enamel epithelium cells remained clearly differentiated and formed focal growths.

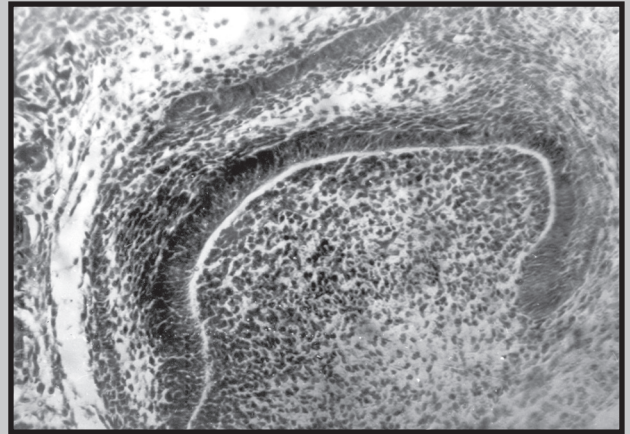


FIG.4. Neck transition of the enamel organ epithelium into the outer enamel epithelium. Large dental papilla. Clear-cut basement membrane. Experiment 4/47. Staining with hematoxylin and eosin. x90.

Conclusions

1. Necrotic and severe dystrophic changes of tooth germs were absent in the experimental animals.
2. During the experiment, numerous single and/or combined disturbances of shaping processes were mainly observed at the site of the neck transition into the enamel organ and in the dental papillae.

References

- [1]. Sevbitov A.V. Remote Consequences of the Chernobyl Catastrophe: Assessment of Children's Dental System State. *Stomatology*, 83(1), (2004), 44-47.
- [2]. Granko S.A. Endogenous and Exogenous Factors Exposure on the Teeth and Surrounding Tissues Condition in Experimental Animals. Organization, Prevention and New Techniques in Dentistry: Materials of the 5th Congress of Dentists of Belarus. Brest, (2004), 374-375.

INFLUENCE OF TECHNOLOGY PRODUCTION ON COMFORT USE OF NONWOVENS SURGICAL GOWNS

JOANNA GRZYBOWSKA-PIETRAS

UNIVERSITY OF BIELSKO-BIALA,
FACULTY OF MATERIALS AND ENVIRONMENT SCIENCES,
INSTITUTE OF TEXTILE ENGINEERING AND POLYMER MATERIALS
2 WILLOWA STREET, 43-309 BIELSKO-BIALA
*MAILTO: JPIETRAS@ATH.BIELSKO.PL

Abstract

The paper presents the results of the impact of technology manufacturing nonwoven, disposable surgical garments on their selected useful properties. During the research examined four most commonly used surgical gowns in the operating rooms and an assessment of their physical and useful characteristics. In connection with the impossibility of assessing resistance to penetration of microorganisms as well as pollination of human epidermal of investigated surgical gowns, made a comparative investigation of filtration characteristics of the evaluation of fractional pore distribution.

The surgical clothing should fulfill requirements for comfort of use, which largely are linked to guidelines for surgical gowns shown in the standard PN-EN 13795-3:2006 "Surgical drapers, gowns and clean air suits, used as medical devices for patients, clinical staff and equipment- Part 3: Performance requirements and performance levels".

According to it, all the available products on the market, which are surgical gowns should be within the specified range of analyzed properties. The obtained results allowed to determine how the manufacturing technology can affect on the barrier protection as well as the comfort of use.

Key words: nonwovens, surgical gowns, comfort of use, spun-bonded, SMS

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 11-12]

Introduction

In the world almost 70% of the textiles used in health care for personal protective equipment including masks, headgear, clothing, surgical gowns, etc. are disposable goods and only 30% of this materials are reusable. A special group of medical products to protect against infectious factors is a disposable clothing for medical staff, visitors and for sick people. [1,4]

Surgical garments should fulfill requirements for comfort of use, which largely are linked to guidelines for surgical gowns shown in the standard PN-EN 13795-3 [6]. The development of manufacturing techniques of gowns have a significant impact on properties connected to the protective properties, which are important to health personnel.

Among the standards for barrier materials used as gowns, mention should be standard:

- EN 13795-1:2002 – describes the general requirements for producers, processors and products,
- EN 13795-2:2002 – presents the test methods,

- EN 13795-3:2002 – describes the requirements and levels of action. [4-6]

Standard EN 13795 states that the surgical covering and gowns must be a barrier to infection. This means that at the time of use they can't leak fluid and microorganisms, they must withstand the proper pressure, which may be exerted on the gowns and covering during the surgery. The requirements for barrier concern:

- Resistance to microbial penetration (dry and wet),
- Resistance to liquid penetration,
- No dust,
- Adhesion,
- Cleanliness- Microbial,
- Cleanliness- Particulate Matter
- Resistance to pushing and tearing (dry and wet).[6]

Materials and methods

For the investigation have been used four disposable surgical gowns received the following techniques: spun lace (SL), spun bonded-melt blown-spun bonded (SB-MB-SB) (gowns compared the two companies X and Y) and spun-bonded + film (SB + F). [2,3]

Nonwoven fabric as well as the final product should have the appropriate functionality to the standard PN-EN 13795-3:2006. In this standard have been specified requirements in relation to the dry and wet microbes penetration resistance, microbiological purity, lack of contaminating particles that could be released mechanically. Requirements for non-polluting particulate material and pollination of materials used in the surgical room are of great importance, since these particles may be a carrier of infectious factors.

The surface mass nonwoven surgical gowns were analyzed according to standard: PN-EN 29073-1:1994, thickness based on the standard PN-EN 29073-1:1994. Air permeability measurements were carried out in accordance with the PN-EN ISO 9237:1998, determination of bending length – PN-EN ISO 9237:1998 and water absorption determined. [4]. There have been also determinate the distribution of pore size distributions using Capillary Porometer PMI company. Obtained results are given in TABLE 1.

TABLE 1. Parameters of nonwovens surgical gowns.

Nonwovens	Raw material composition	Basis weight of nonwovens [g/m ²]	Thickness [mm]	Density [kg/m ³]
SL	40% PET / 60% viscose	65,6	0,6	110,8
SMS Company X	100% PP	38,6	0,4	97,4
SMS Company Y	100% PP	35,2	0,4	93,2
SB+F	80% PP+ 20% PE	42,4	0,3	148,4

Results an discussion

The obtained results the influence of manufacturing techniques on selected properties of surgical gowns made of nonwovens are given in TABLE 2 and illustrated on FIGURES 1-4.

TABLE 2. The results of measurements.

Parameter	SL	SMS		SB+F
		Company X	Company Y	
Water absorption [g/m ²]	31,6	92,3	69,6	41,60
Air permeability [dm ³ /m ² ·s] Δp=500Pa	1081	1452	2204	1,12
Pore size distribution [μm]				
-Bubble Point [μm]	376,6	62,3	663,2	below 2
-Average Diameter [μm]	39,5	21,7	86,8	

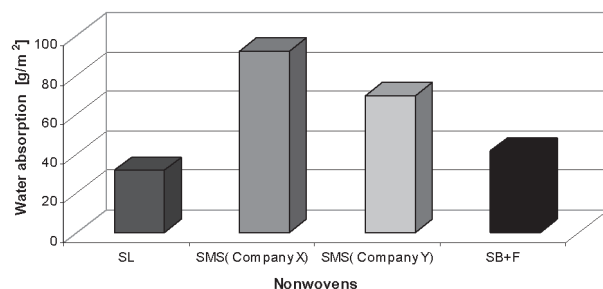


FIG.1. Influence of surgical gowns manufacturing technology on the water absorption.

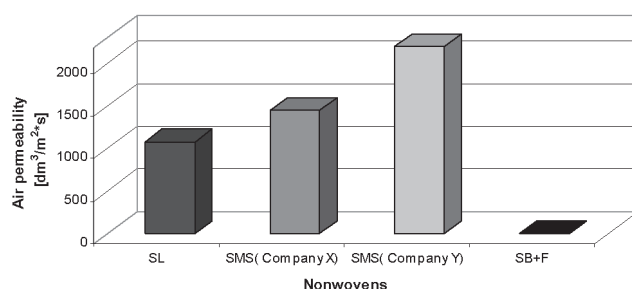


FIG.2. Influence of surgical gowns manufacturing technology on the air permeability.

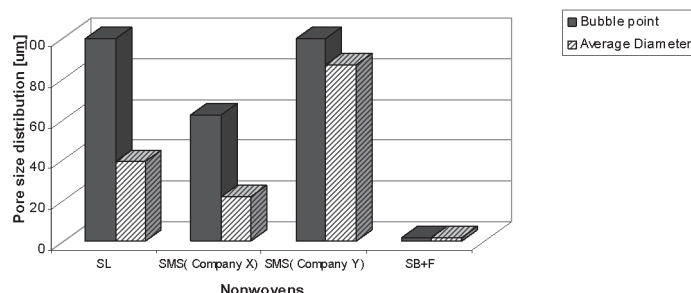


FIG.3. Influence of surgical gowns manufacturing technology on the pore size distribution

technology can be seen that these products having similar surface mass and thickness, have different air permeability as well as size pores. In the case of surgery gown from company Y such pore size (86,8 μm) does not guarantee protection against microorganisms (pathogens). The best protection agents the transmission of infectious is SMS nonwoven company X, which has pore sizes below 22 μm and the air permeability equal 1452 dm³/m²·s.

Preferably against the fluid protect nonwoven foiled, because they characterized low air permeability. However, this reduces the physiological comfort of use, which is why they are used as an additional element of gown in critical area of product. For urological gowns critical field is fixed only spot, in the case of reinforced surgical gowns the total insulation against microorganisms (pathogens) is achieved by full fusing a barrier element in the boxes on the sleeves and on the front of gown.

References

- [1] Albrecht W., Fuchs H., Kittelmann W. Nonwoven fabrics, ISBN 3-527-30406-1, Wiley-VCH, Weinheim 2003
- [2] Zuska N.: Odzież ochronna jednorazowego użytku stosowana w szpitalnictwie – budowa i właściwości, Praca dyplomowa, ATH: 2008
- [3] Grzybowska-Pietras J., Malkiewicz J., Estimation of properties and comfort of nonwovens surgical gowns. Innovative materials and technologies in made – up textile articles and footwear, Technical University of Lodz, 2008; 210-213
- [4] PN-EN 13795-1:2002 Obłożenia chirurgiczne, fartuchy chirurgiczne i odzież dla bloków operacyjnych, stosowane jako wyroby medyczne dla pacjentów
- [5] PN-EN 13795-2. Obłożenia chirurgiczne, fartuchy chirurgiczne i odzież dla bloków operacyjnych, stosowane jako wyroby medyczne dla pacjentów- Część 2- Metody badania
- [6] PN-EN 13795-3. Obłożenia chirurgiczne, fartuchy chirurgiczne i odzież dla bloków operacyjnych, stosowane jako wyroby medyczne dla pacjentów-Część 3; Wymagania użytkowe i poziomy ochrony

Conclusions

Investigations of nonwoven medical garments have shown that the technique of nonwovens production has an influence on the properties and its intended use.

Surface mass medical garment does not exceed 40 g/m², the exception is surgical gown received from technique spun-lace (65,6 g/m²).

Analyzing the obtained results of surgical gowns produced by two companies (X and Y) received the SMS

ELECTROSPUN BIOMIMETIC RESORBABLE SCAFFOLD

IZABELLA RAJZER^{1*}, WOJCIECH PIEKARCZYK², RYSZARD KWIATKOWSKI¹, WŁODZIMIERZ BINIAŚ¹, JAROSŁAW JANICKI¹

¹ATH, UNIVERSITY OF BIELSKO-BIALA,
FACULTY OF MATERIALS AND ENVIRONMENTAL SCIENCES,
INSTITUTE OF TEXTILE ENGINEERING AND POLYMER MATERIALS,
DEPARTMENT OF POLYMER MATERIALS,

2 WILLOWA 2 STREET, 43-309 BIELSKO-BIALA, POLAND

²AGH, UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
DEPARTMENT OF ADVANCED CERAMICS

30 MICKIEWICZ AVENUE, 30-059 CRACOW, POLAND

*MAILTO: IRAJZER@ATH.BIELSKO.PL

[*Engineering of Biomaterials*, 99-101, (2010), 13-15]

Introduction

The selection of the most appropriate material to produce a scaffold to be used in bone tissue engineering applications is a very important step towards the construction of a successful tissue-engineered product [1]. Poly (lactic acid) (PLA) is linear aliphatic polyester that is biocompatible and biodegradable, and has three stereoisomeric forms, poly (L-lactic acid) (PLLA), poly (D-lactic acid) (PDLA), and poly (L-D-lactic acid) (PLDLA) [2]. PLA is known to be one of the more utilized biomaterials, due to its degradation by hydrolysis and well-characterized mechanical properties, as well as its biocompatibility [3].

Electrospun nanofibrous scaffolds aimed to mimic the architecture and biological functions of the extra-cellular matrix (ECM), are considered as very promising substrates for tissue engineering, due to highly porous structure with interconnected pores and tremendous surface area that is similar to the scale of ECM [4]. Electrospinning is a simple method that can be used to prepare polymeric or composites fibers having diameters on the nano- to micro- scale [5]. Basically, an electrospinning system consists of three major components: a high voltage power supply, a spinneret and a grounded collecting plate [6]. In electrospinning electrostatic field stretches the polymer solution into interconnected nanofibers web [7]. Solution and processing parameters such as viscosity, molecular weight, concentration of polymer, applied voltage, tip to collector distance, conductivity etc. significantly affect the fibres morphology [8]. By manipulation of these parameters we can obtain desired properties for specific application.

For bone tissue regeneration, biodegradable polymers are commonly combined with bioceramics either before or after the electrospinning process [9]. Many different ceramic-polymers electrospun system have been studied [10-13]. The incorporation of nanofillers into the biodegradable polymer matrix enhanced mechanical properties [10], and significantly improved osteoblastic cellular responses [13]. In general, the addition of these inorganic phases resulted in an increase of the bioactivity of the material.

The objective of this research is the development and characterization of electrospun nanocomposites PLDL/n-HAp for bone tissue engineering scaffolds. Biomimetic growth of calcium phosphate on the surface of electrospun biomaterials after immersion in simulated body fluid solution was studied using WAXD and FTIR methods.

Materials and methods

Materials

L-lactide / DL-lactide (PLDL) copolymer was purchased from PURAC, The Netherlands. Nano-hydroxyapatite (n-HAp) was synthesised at UST-AGH (Cracow, Poland). An average size of the n-HAp particles was 23 nm. The specific surface area of the n-HAp was 79.9 sq. m/g. 1g of PLDL copolymer was dissolved at room temperature under magnetic stirring in 50 ml of acetone. For the composite scaffold the PLDL-acetone solution was mixed with 20 wt% of n-HAp and the suspension was ultrasonicated. Both solutions were prepared overnight until the solution became homogeneous. The solutions were fed through a capillary tip (diameter 0.7 mm) using a manual syringe (25 ml). Electrospinning was carried out using custom-made apparatus consisting of a power supply, syringe and electrodes. The solutions were spun at a working distance of 20 cm with a driving force of 30 kV. The solution flow rate was 15 ml/h. The fibers were dried in flight and collected on the aluminium foil wrapped on a rotating metal drum. PLDL (as control), and composite PLDL/n-HAp nonwovens were obtained using this method [14].

Samples characterization

Uniaxial tensile tests were carried out on electrospun samples. Mechanical tests were performed at 1.0 mm/min to rupture by an electromechanical machine Zwick-Roell Z 2.5. Five specimens were considered for each electrospun matrix.

The microstructure of both polymer fibrous scaffolds was imaged by scanning electron microscopy (SEM) (Jeol, JSM 5500). The average fibre diameter of the electrospun fibres was measured from the SEM images.

All FTIR spectra were recorded using fotoacoustic reflectance (MTEC Photoacoustics 300 THERMO NICOLET) at the range of 4000–400 cm⁻¹ using at least 64 scans and 4 cm⁻¹ resolution.

The wide angle X-ray diffraction measurements (WAXD) were carried out on a Seifert URD6 diffractometer, equipped with ISO-DEBYEFLEX 3003 high voltage generator and a graphite monochromator. A copper target sealed X-ray tube operated at U= 40 kV and I = 30 mA was used as the radiation source ($\lambda=1.542 \text{ \AA}$). The step scanning measurement mode was employed over a 2θ scattering angle ranging from 5° to 60° and from 22.5° to 37.5°, with a step-size of 0.05°.

Bioactivity of the scaffolds

Simulated body fluid solution (SBF, pH 7.4) was prepared according to Kokubo et al. [15]. The samples of PLDL/n-HAp and PLDL were immersed in 1.5xSBF solution and storage at the temperature of 37°C during 14 days. The solution was replaced every 2.5 days. After 1, 3, 7 and 14 days the samples were washed with distilled water and then dried at room temperature. In order to investigate the effect of n-HAp content on the properties PLDL/n-HAp nanocomposites scaffold after different time of incubation in SBF solution, FTIR spectra as well as WAXD patterns were recorded after each time-point of experiment.

Results and discussion

FIG.1 shows SEM images of the electrospun PLDL (a) and PLDL/n-HAp (b) webs. From the SEM images we can find clearly that the PLDL nonwovens are formed by the long fibers with smooth surface whose diameter range from 400 nm to 3.2 μm . The average diameter of PLDL fibers is $1.7 \pm 0.5 \mu\text{m}$. The surface of composite fibers is rough, and when

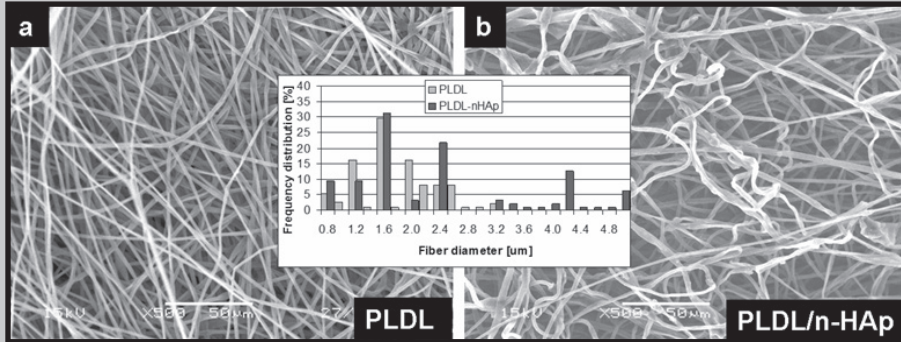


FIG.1. Morphology of electrospun scaffold (a) PLDL, (b) PLDL/n-HAp, (c) Fibers diameter distribution.

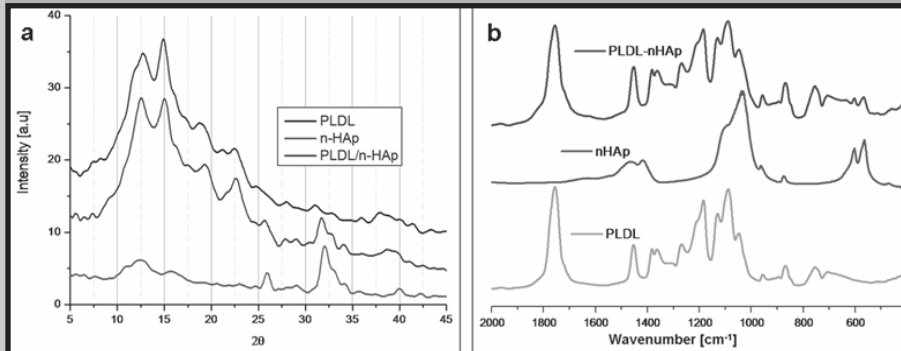


FIG.2. The comparison of : a) WAXD patterns (left side) and b) FTIR spectra (right side) of PLDL, PLDL/n-HAp and HAp samples.

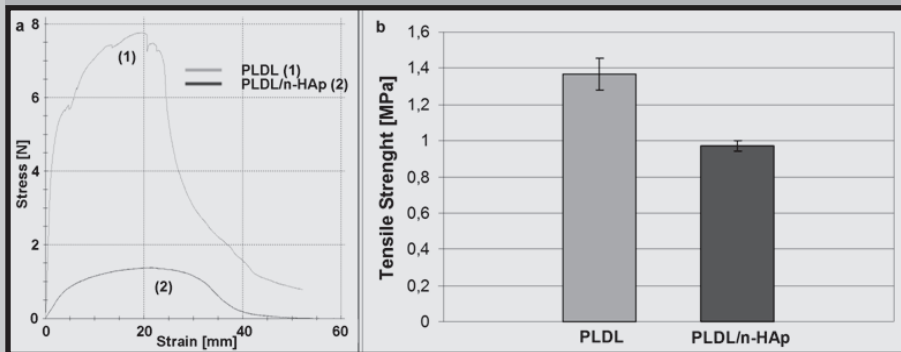


FIG.3. (a) Stress-strain curves obtained from tensile tests performed on electrospun PLDL (1) and PLDL/n-HAp (2); (b) Tensile strength of electrospun nonwovens.

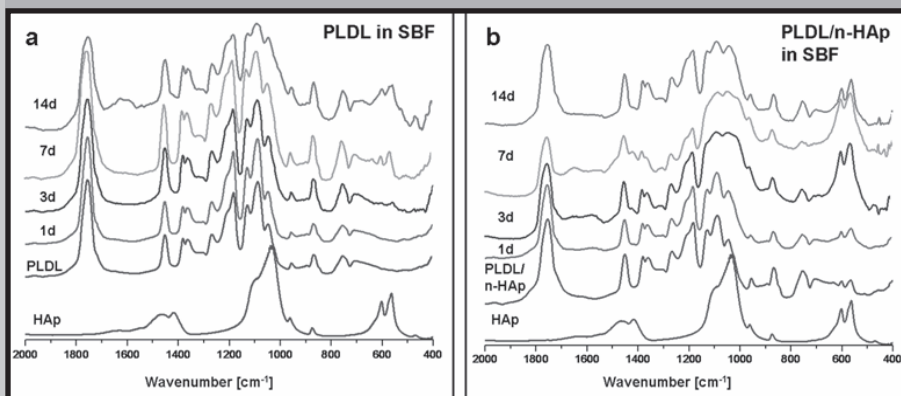


FIG.4. FTIR spectrum for a control sample (PLDL) and composite sample (PLDL/n-HAp) after different time of immersion in SBF solution.

that of PLDL. As a result of electrospinning method we have obtained a randomly oriented mats of fibers with a high porosity due to the high ratio of surface area to volume.

FIG.2a shows WAXD patterns of pure PLDL, n-HAp powder and the composite PLDL/n-HAp. In accordance with the card 090432 of HAp [16] the diffraction peaks at: $2\theta = 25.9^\circ, 31.8^\circ, 32.2^\circ, 32.9^\circ, 34.0^\circ$, clearly visible on both the WAXD pattern of n-HAp sample and the WAXD pattern of PLDL/n-HAp sample, can be assigned respectively to: (002), (211), (112), (300) and (202) planes of the hydroxyapatite crystalline structure. Also the FTIR results confirmed the presence of HAp powder in electrospun composite mats. The FTIR spectra of HAp, PLDL and PLDL/n-HAp composite membranes are presented in FIG.2b. The C=O absorbance band at 1760 cm^{-1} in the poly(L-D-lactide) chains has been used as a typical characteristic band, which can be observed in both PLDL and PLDL/n-HAp samples. The characteristic bands corresponding to the stretching vibrations of PO_4^{3-} ($956; 1033; 1107\text{ cm}^{-1}$) and deformation vibrations of PO_4^{3-} ($566; 605\text{ cm}^{-1}$) can be identified, which do not appear in the case of pure PLDL. The results confirmed that HAp particles were successfully incorporated into the electrospun composite scaffold.

Tensile testing is often used as a method to determine and compare mechanical properties of electrospun mats. The tensile strength is affected by both the porosity of fibrous composites and by the n-HAp particles incorporated in the polymer matrix. Representative stress-strain curves of electrospun PLDL and PLDL/n-HAp are shown in FIG.3a. There is a significant difference in the tensile strength and tensile behaviour. Addition of n-HAp powder resulted in decrease of mechanical properties of obtained nonwovens (FIG.3b) probably due to the agglomeration of n-HAp particles. The larger sized HAp particles act as a flaws in the PLDL matrix due to limited interfacial bonding. The tensile strength decrease from 1.3 MPa for unmodified scaffold to 0.9 MPa for composite material.

During the incubation in SBF the character of electrospun scaffolds changed markedly by abundant deposits. Bone-like crystalline apatite layers completely covered the surface of modified composite samples. Spherical calcium phosphate were

precipitated onto the nonwovens surface proving its bio-activity [14].

FTIR spectra were recorded (FIG.4) in order to investigate

using high magnification we could observed HAp particles on the surface of fibers. The composite fibers are distributed with the range of $400\text{ nm}-5.0\text{ }\mu\text{m}$. The average diameter of the composite fibers is about 2.8 ± 1.4 which is bigger than

PILOTAŻOWE BADANIA KLINICZNE NAD EFEKTYWNOŚCIĄ ELASTYCZNEGO KOMPOZYTU OPARTEGO NA HAp DLA WYPEŁNIANIA UBYTKÓW KOSTNYCH

BELCARZ A.¹, GINALSKA G.¹, POLKOWSKA I.², PRZEKORA A.¹, ŚLÓSARCZYK A.³, ZIMA A.³, PASZKIEWICZ Z.³

¹UNIwersytet Medyczny w Lublinie,
Katedra i Zakład Biochemii i Biotechnologii,
ul. Chodźki 1, 20-093 Lublin, Polska

²UNIwersytet Przyrodniczy,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
ul. Głębocka 30, 290812 Lublin, Polska

³AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,
Katedra Technologii i Ceramiki,
Al. Mickiewicza 30/B6, 30-059 Kraków, Polska

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 16-18]

Wstęp

Hydroksyapatyt (HAp) jest dobrze znanym wypełniaczem ubytków kostnych, cenionym – zwłaszcza w formie porowatej – za biokompatybilność, bioaktywność, osteokonduktywność, brak własności alergizujących, niekancerogenność i podatność na sterylizację [1-3]. Wadami jego jest słaba resorpcja, kruchość oraz niewielka odporność na złamanie [4]. Ponadto czysto praktycznym negatywnym aspektem pracy z hydroksyapatytem jest jego mała poręczność chirurgiczna, na którą skarżą się chirurdzy. W celu polepszenia własności mechanicznych oraz poręczności chirurgicznej tego wypełniacza można wprowadzać do niego dodatek substancji spajających i zwiększających elastyczność np. żelu fibrynowego [5], kolagenowego czy opatentowanych BioLinkerów.

Ostatnie badania wykazały, że czynnikiem uplastyczniającym może być dodatek glukanu, substancji wykazującej pozytywne efekty w leczeniu przeciwwirusowym i przeciwbakteryjnym. Kompozyt, zawierający glukan i HAp w postaci wysokoporowatych granul, charakteryzuje się dobrymi parametrami mechanicznymi, zbliżonymi do parametrów kości gąbczastej i bioaktywnością w SBF. W prezentowanej pracy przetestowano próbki kompozytu z zastosowaniem linii komórkowej prawidłowych ludzkich osteoblastów oraz po wszczepieniu w obręb przetok ustno-nosowych u psów. Celem przeprowadzanych doświadczeń było pilotażowe określenie cytotoksyczności kompozytu oraz jego wpływu na gojenie się przetok ustno-nosowych in vivo.

Materiały i metody

Kompozyt HAp-glukan został przygotowany zgodnie z protokołem opisanym w patencie P-387872.6

Cytotoksyczność granul HAp i materiału kompozytowego oszacowano metodą pośrednią przez zastosowanie odpowiednich ekstraktów. Test NRU (Neutral Red Uptake) wykonano z zastosowaniem linii prawidłowych płodowych ludzkich osteoblastów hFOB 1.19, pochodzącej z banku komórek ATCC (American Type Culture Collection, Menassas, VA). Hodowlę prowadzono w temperaturze 34°C i atmosferze 5% CO₂. Zawiesinę komórek hFOB o gęstości 3 • 10⁵ komórek/ml podłoża rozlano w ilości po 100 µl/dolek

PILOT CLINICAL STUDY OF EFFICACY OF FLEXIBLE HAp-BASED COMPOSITE FOR BONE DEFECTS REPLACEMENT

BELCARZ A.¹, GINALSKA G.¹, POLKOWSKA I.², PRZEKORA A.¹, ŚLÓSARCZYK A.³, ZIMA A.³, PASZKIEWICZ Z.³

¹MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN,
CHAIR AND DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY,
1 CHODZKI STR., 20-093 LUBLIN, POLAND

²UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES,
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE,
30 GŁĘBOKA STR., 20-612 LUBLIN, POLAND

³AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
CHAIR OF TECHNOLOGY AND CERAMICS,
30/B6 MICKIEWICZ AVE., 30-059 CRACOW, POLAND

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 16-18]

Introduction

Hydroxyapatite (HAp) is a well-known filler for bone defects, appreciated – especially in porous form – for its biocompatibility, bioactivity, osteoconductivity, lack of allergic reactions occurrence and carcinogenous properties and susceptibility to sterilization [1-3]. Its disadvantages are poor resorption and low fracture toughness [4]. Moreover, the practical aspect of HAp handling is its poor surgical handiness which is the subject of surgeons complains. To improve mechanical properties and surgical handiness of this filler, some glues and elasticity-increasing factors may be added such as fibrin glue [5], collagen gel or patented BioLinkers.

Recent studies revealed that glucan, which also shows antiviral and antibacterial properties, might be considered as such a plasticizing agent. The composite, containing glucan and HAp in a form of highly porous granules, shows good mechanical parameters (resembling those of human spongy bone) and bioactivity in SBF. In presented work, composite samples were tested using human osteoblasts cell line and also after implantation to oronasal fistulae in dogs. The aim of performed experiments was pilot testing of composite cytotoxicity and its effect on oronasal fistulae healing in vivo.

Materials and methods

Composite HAp-glucan was prepared according to procedure described in Polish Patent P-387872.6

The HAp and the composite cytotoxicity levels were evaluated indirectly by means of fluid extracts. The NRU (Neutral Red Uptake) assay was carried out using hFOB 1.19 cell line (human fetal osteoblasts) obtained from ATCC (American Type Culture Collection, Menassas, VA). Cells were cultured at 34°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. HFOB cells were seeded in 96-multiwell plates in 100 µl complete culture medium at a concentration of 3 • 10⁵ cells/well and cultured for 24 hours at 34°C to near confluence. Then the growth medium was replaced with the pure HAp or composite extracts. After 24 h of incubation at 34°C, the NRU colorimetric assay was performed to evaluate cell viability.

Extracts were obtained by immersing the test materials in a complete culture medium supplemented with 2% FBS under standard conditions: 72h, at 37°C without agitation.

do 96-wielodółkowych płytek i prowadzono inkubację przez 24 godziny w 34°C. Następnie podłoże wzrostowe znad hodowli zastąpiono 100% ekstraktami pozyskanymi z granul HAp i materiału kompozytowego. Po 24 godzinnej inkubacji z ekstraktami, wykonano test NRU w celu oszacowania żywotności komórek.

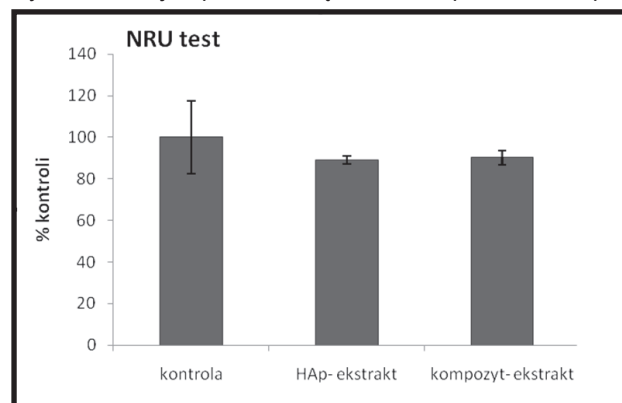
Ekstrakty z testowanych materiałów przygotowano w standardowych warunkach. Biomateriał kompozytowy i granule HAp umieszczono w pełnym podłożu hodowlanym z dodatkiem 2% FBS w stosunku 0,1 g materiału/ml podłoża i inkubowano bez wyrząsania w temperaturze 37°C przez 72 godziny. Kontrolę negatywną stanowiło podłoże hodowlane inkubowane w analogicznych warunkach, ale bez materiału testowego. Do testów wykorzystano 100% eluaty.

Wszczepienia próbek kompozytu (wysterylizowanych tlenkiem etylenu) do przetoki ustno-nosowej dokonano u 5 psów (pacjenci Kliniki Chirurgii Małych Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie). Po nacięciu i odpreparowaniu płata śluzówkowo-okostnowego przeprowadzono skaryfikację zębodołu, przepłukano 5% roztworem gentamycyny, następnie zaimplantowano stożek kompozytu (nasączony sterylną wodą destylowaną i odpowiednio dopasowany do rozmiarów ubytku). Zębodoł od strony jamy ustnej zamknięto wcześniej odpreparowanym płatem śluzówkowo-okostnowym przy pomocy szwów.⁷ Ranę przemywano codziennie 0,15% roztworem chlorheksydyny oraz miejscowo stosowano maść Metronidazol.

Wyniki i dyskusja

Zastosowany test NRU jednoznacznie wskazuje na brak toksyczności zarówno samych granul HAp, jak i materiału kompozytowego wobec komórek linii hFOB (RYS.1). Dodanie glukanu do granul HAp nie spowodował istotnego obniżenia żywotności tych komórek w porównaniu z samymi granulami ceramicznymi.

Wprowadzenie kompozytu do przetoki ustno-nosowej u psów spowodowało bardzo szybkie (już po upływie 7-9 dni) zagojenie rany pooperacyjnej, bez śladów infekcji lub objawów zapalnych przez okres 4 miesięcy po operacji wszczepienia. Zdjęcia RTG miejsca poimplantacyjnego wykazało, że już po 1 miesiącu ciemne przestrzenie po-



RYS.1. Ocena cytotoksyczności ekstraktów pozyskanych z granul HAp i materiału kompozytowego wobec komórek linii hFOB po 24 godzinnej inkubacji. Wyniki zostały przedstawione jako % kontroli negatywnej i wyrażone jako wartości średnie \pm SD. **FIG.1.** Cytotoxicity evaluation of the HAp and composite extracts using hFOB cells after 24 hours of incubation by means of NRU assay. The results were expressed as the percentage of OD values obtained from the negative control and reported as the mean \pm SD.

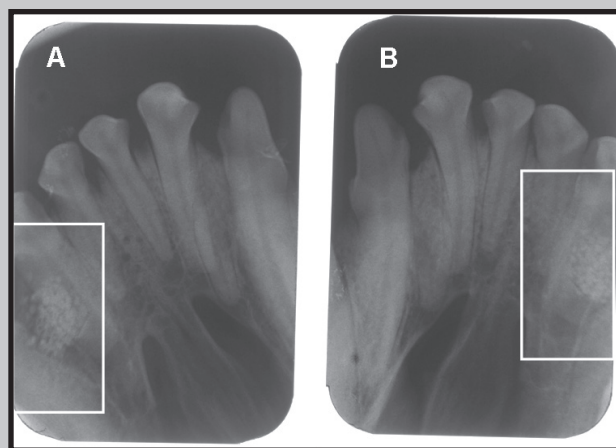
The ratio between the sample weight and the volume of the extraction vehicle was 0,1 g/ml beyond the absorptive capacity of the material. The extraction vehicle with no test material served as negative control. In the investigation, the pure extracts were used.

Implantation of composite samples (sterilized with ethylene oxide) into oronasal fistulae was performed for 5 dogs (patients of Clinic of Small Animals Surgery at University of Life Sciences in Lublin). After incision and preparation of mucoperiosteal flat, scarification of dental alveolus and washing with 5% gentamicin, the implantation of composite cone (soaked with sterile distilled water and properly fitted into dimensions of defect) was performed. Dental alveolus was closed using earlier prepared mucoperiosteal flat with sutures.⁷ The wound was washed daily with 0,15% chlorhexidine and locally treated with Metronidazole.

Results and discussion

The NRU test used in the experiments clearly shows lack of toxicity effect of both HAp granules and composite biomaterial on hFOB cells (FIG.1). Adding glucan to HAp granules did not affect cell viability.

Implantation of composite into dog's oronasal fistulae in case caused immediate (just after 7-9 days) healing of post-operative wound without signs of infection or inflammation for 4 months after the implantation procedure. RTG pictures of post-implantation site showed that after 1 month dark spaces between HAp granules became brighter, which indicates the beginning of mineralisation of these spaces and beginning of composite remodelling (FIG.2).



RYS.2. Zdjęcia RTG przetoki ustno-nosowej u psa wypełnionej próbką kompozytu HAp-glukan. A- Miejsce implantacji bezpośrednio po zabiegu (A) i 1 miesiąc od zabiegu wszczepienia (B).

FIG.2. RTG pictures of oronasal fistulae (in dog), filled with sample of HAp-glucan composite. Implantation site directly after the procedure (A) and after 1 month (B).

Conclusions

Obtained results suggest the composite prepared for bone defects repair does not show toxicity effect on osteoblasts. After implantation into oronasal fistulae in dogs, good results of post-operative wound healing, as well as the beginning of composite remodelling process were shown. The results of presented studies suggest that prepared HAp-glucan composite possesses good properties as a bone defects filler.

między białymi granulami HAP zaczęły się przejaśniać, co sygnalizuje początek mineralizacji tych miejsc i początek przebudowy kompozytu (RYS.2).

Wnioski

Uzyskane wyniki sugerują, że testowany kompozyt kościostępczy HAp-glukan nie wykazuje toksyczności wobec komórek osteoblastycznych. Po implantacji do przetok ustno-nosowych u psów wykazano dobre gojenie się rany pooperacyjnej oraz początek przebudowy wszczepionego materiału. Wyniki prezentowanych badań biologicznych świadczą o dobrych właściwościach wytworzonego kompozytu HAp-glukan do wypełnień ubytków kostnych.

Podziękowania

Praca naukowa finansowana ze środków własnych UM w Lublinie na naukę DS2/09, PW1/09 oraz projektu badawczego UDA-POIG.01.03.01-00-005/09-01.

ZMIANY POWIERZCHNI IMPLANTU METALOWEGO POKRYTEGO POWŁOKĄ POLIMEROWĄ POD WPŁYWEM KONTAKTU Z PŁYNEM FIZJOLOGICZNYM

M.CIEŚLIK^{1,2*}, K.ENGVALL³, J.PAN⁴, A.KOTARBA¹

¹WYDZIAŁ CHEMII, UNIwersYTET Jagielloński,
INGARDENA 3, 30-060 KRAKÓW, POLSKA

²INSTYTUT METALURGII I INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, PAN,
W.REYMONTA 25, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

³SWEREA KIMAB AB., P. O. Box 55970,
SE-10216 SZTOKHOLM, SZWECJA

⁴INSTYTUT NAUKI O POWIERZCHNI I KOROZJI, WYDZIAŁ CHEMII,
KRÓLEWSKA SZKOŁA WYŻSZA, DROTTNING KRISTINAS VÄG. 51,
SE-100 44 SZTOKHOLM, SZWECJA
MAILTO: CIESLIK@CHEMIA.UJ.EDU.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 18-21]

Wstęp

Ze względu na swoje własności mechaniczne, zdolność do nadawania kształtów oraz niską cenę w porównaniu z innymi metalicznymi materiałami implantacyjnymi (stopy tytanu i kobaltu) stal nierdzewna jest często używanym materiałem implantacyjnym. Jednak, podczas długotrwałego kontaktu z tkankami ludzkimi następują procesy korozyjne na powierzchni stali związane z niepożądanym uwalnianiem jonów metali takich jak: żelazo, chrom i nikiel [1]. Korozja i proces uwalniania jonów powodują nie tylko uszkodzenia mechaniczne implantów, ale również odczuwania bólu w pobliżu wszczepionego implantu. Dlatego też implanty wymagają specyficznego rodzaju obróbki powierzchniowej w celu zminimalizowania szkodliwych zjawisk [2]. Obecnie, powłoki polimerowe wykorzystywane są do modyfikacji

Acknowledgements

This work was supported by financial support from Medical University of Lublin (DS2/09, PW1/09) and UDA-POIG.01.03.01-00-005/09-01 project.

Piśmiennictwo

References

- [1] Jarcho M., Kay J.F., Kumar K.I., Doremus R.H., Drobeck H.P. J. Biosci. Bioeng. 1 (1977) 79-91.
- [2] Kokubo T., Kim H.-M., Kawashita M. Biomaterials 24 (2003) 2161-2175.
- [3] Sopyan I., Mel M., Ramesh S., Khalid K.A. Sci. Tech. Adv. Mater. 8 (2007) 116-123.
- [4] Porter A.E., Botelho C.M., Lopes M.A., Santos J.D., Best S.M., Bonfield W. J. Biomed. Mater. Res. A 69 (2004) 670-679.
- [5] Le Nihouannen D., Le Guehennec L., Rouillon P., Bilban M., Layrolle P., Daculsi G. Biomaterials 27 (2006) 2716-2722.
- [6] Belcarz A., Ginalska G., Ślósarczyk A., Paszkiewicz Z. Bioactive composite and process for the production of the same. 2009; Polish Patent PL-387872
- [7] Smith M.M. Clin. Tech. Anim. Pract. 15 (2000) 243-250

CHANGES IN POLYMER COATED METAL IMPLANT SURFACE UPON CONTACT WITH BODY FLUID

M.CIEŚLIK^{1,2*}, K.ENGVALL³, J.PAN⁴, A.KOTARBA¹

¹FACULTY OF CHEMISTRY, JAGIELLONIAN UNIVERSITY,
3 INGARDENA STR., 30-060 KRAKOW, POLAND,

²INSTITUTE OF METALLURGY AND MATERIALS SCIENCE, PAS,
25 W.REYMONTA STR., 30-059 KRAKOW, POLAND

³SWEREA KIMAB AB. P. O., Box 55970, SE-10216 STOC-
KHOLM, SWEDEN.

⁴DIV. OF SURFACE & CORROSION SCIENCE, DEPT. OF CHEMISTRY,
ROYAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY, DROTTNING KRISTINAS VÄG.
51, SE-100 44 STOCKHOLM, SWEDEN
MAILTO: CIESLIK@CHEMIA.UJ.EDU.PL

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 18-21]

Introduction

Stainless steel (SS) due to its mechanical strength, the capability to bend and shape and relatively low cost in comparison with titanium or cobalt alloys is one of the most common used orthopaedic implant material. However, upon prolonged contact with human tissue (corrosion phenomena take place on SS surface resulting in undesirable release of hazardous for health transition metal ions [1]. The corrosion process, accompanied by release of ions, leads not only to mechanical failure of implant but also to local pain and swelling in the near implant region. Therefore, the metal based implants need specific surface finishing in order to minimizing the adverse effects [2]. Nowadays, in many industrial areas polymer coatings for surface modification are widely applied and it was already suggested that this

i zabezpieczania powierzchni metalicznych w różnych gałęziach przemysłu, ten rodzaj strategii może być również zastosowany do ochrony powierzchni implantów [3]. Jednym z rodzajów polimerów wykorzystywanych obecnie w wytworzeniu implantów jest parylen (poli-para-xililen) ze względu na jego wysoką biokompatybilność i możliwość wytworzenia cienkiej, ciągłej i chemicznie inertej powłoki. Często też stosuje się silan (A174) jako warstwa adhezyjna ułatwiająca związanie powłoki parylenowej z powierzchnią stali. Większość prowadzonych badań nad powłokami polimerowymi ma na celu zwiększenie odporności korozyjnej powierzchni metalowych implantów. Odporność korozyjna i biogodność są bowiem podstawowymi własnościami, które muszą wykazywać metalowe implanty. Dlatego też prowadzi się badania nad procesów zachodzących na powierzchniach implantów metalowych w kontakcie z płynami ustrojowymi. Do tego celu wykorzystuje się szereg metod fizykochemicznych. Szczególnie miejsce zajmują pomiary elektrochemiczne w środowisku płynów ustrojowych, których wyniki wykazują wysoką zgodność z testami biokompatybilności prowadzonymi in vivo [4].

Celem przeprowadzonych badań był monitoring zmian polimerowych powłok ochronnych osadzonych na powierzchni stali implantacyjnej oraz ocena funkcji antykorozyjnych podczas kontaktu powierzchni implantu ze sztucznymi płynami fizjologicznymi (Hanksa i Hanksa z dodatkiem nadtlenu wodoru).

Materialy i metodyka badań

Próbki stali nierdzewnej 316L z obróbką powierzchni BA (bright annealed) były przemyte, wytrawione oraz pokryte różnymi rodzajami powłok. Pierwsza seria próbek była pokryta za pomocą metody zanurzeniowej monowarstwą silanu (A 174). Na drugą serię próbek nałożono parylen N metodą osadzania z fazy gazowej (CVD). Trzecia seria próbek została pokryta warstwą podwójną (silan + parylen N). Tak przygotowane próbki badano elektrochemicznie w płynach ustrojowych oraz prowadzono obserwacje mikroskopowe. Pomiary elektrochemiczne wykonywane były w płynie Hanksa, który jest mieszaniną sztucznych soli fizjologicznych (pH=7.4). Dodatkowo, w celu symulacji odczynów zapalnych organizmu, w niektórych eksperymentach został dodany nadtlenek wodoru (100mM). Pomiary przy pomocy elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (ESI) były wykonywane w celi z trzema elektrodami (elektroda pracująca, Pt elektroda licząca i Ag/AgCl elektroda odniesienia). Elektrody były podłączone do 1287 Electrochemical Interface połączonego z analizatorem częstotliwości Solartron 1250. Dla rejestracji zmian zachodzących na powierzchni próbek pomiary ESI zostały przeprowadzone po czasie 1 godziny, a dla podwójnej powłoki polimerowej pomiary te zostały powtórzone odpowiednio po 1, 3, 7 i 9 dniach. Spektra z pomiarów ESI analizowane były za pomocą diagramów Nyquista. Morfologia powierzchni próbek była analizowana przy pomocy mikroskopu skaningowego (SEM) FEI E-SEM XL30 i mikroskopu konfokalnego (CM) Olympus LEXT OLS3100.

Wyniki i dyskusja

Typowe zdjęcia mikroskopowe (SEM i CM) powierzchni stali implantacyjnej wraz z odpowiadającymi im widmami ESI uzyskane po 1 godzinie kontaktu z płynem Hanksa przedstawiono na RYS.1. Wykazują one, że zastosowany układ polimerowy tworzy gładką i jednorodną warstwę ochronną na powierzchni stali nierdzewnej. Wyniki pomiarów elektrochemicznych ESI pokazały, że podwójna war-

kind of strategy can be used for coating of medical devices [3]. One of the polymers used today for medical devices is parylene N (poly-para-xylylene). Its applications results from its excellent biocompatibility and possibility to form a thin, continuous and inert film on a metal surface. Pre-treatment with the organic silane A174 as an adhesion promoter to parylene coating is the recommended surface preparation. Most investigations on coatings used for medical devices aim at increasing the corrosion resistance, which together with their biocompatibility are the two fundamental properties of metal implants. For monitoring the processes taking place on metal implant surfaces in artificial biological environments the electrochemical methods (such as Electrochemical Impedance Spectroscopy) are often used, because they provide the results, which are in good agreement with biocompatibility response of the metal materials obtained from the in vivo experiments [4].

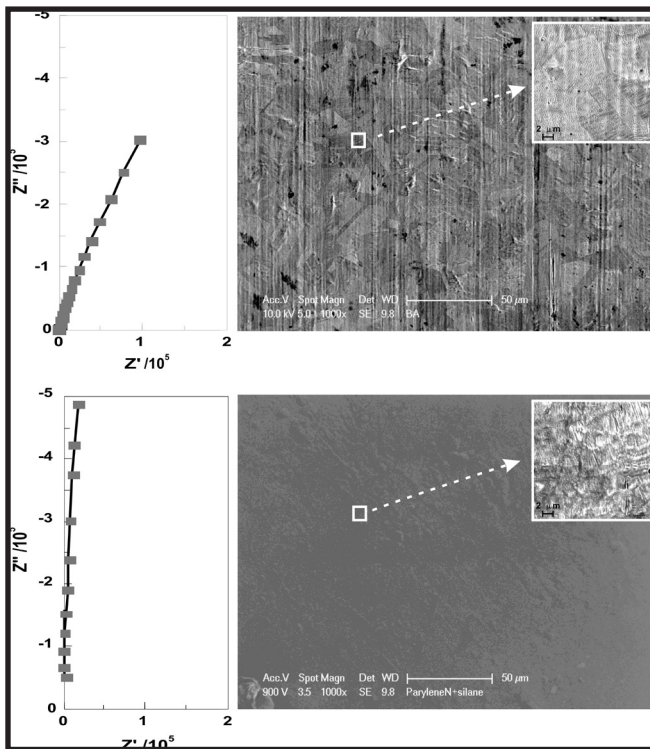
The aim of the present study was to monitor the changes in polymer coating (silane+parylene) on SS (316L) and to evaluate its protective function upon exposure to body fluids of Hanks solution and Hanks solution with the addition of H_2O_2 (simulating the inflammatory response).

Experimental

Samples of SS 316L grade with bright annealed (BA) surface finishing were cleaned, pickled and coated by different polymers coatings. One part of the SS samples was covered by a monolayer of silane A174 using a dipping method. Second part was coated by parylene N with the use of chemical vapour deposition (CVD) method. Third part was covered by double layer polymer coating (silane + parylene N). All three series of samples were investigated by means of microscopic observations and electrochemical measurements. The morphology of the coated surface was analysed by scanning electron microscopy (SEM) FEI E-SEM XL30 and laser confocal microscopy (CM) Olympus LEXT OLS3100. The electrochemical investigations were performed in Hanks solution, which is an artificial salts mixture (pH=7.4). Additionally, to simulate the conditions of an inflammatory response, in selected experiments, 100 mM H_2O_2 was added. The Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) were performed using a typical three electrode set-up consisted of a sample work electrode, a Pt mesh counter electrode and Ag/AgCl reference electrode. The electrodes were connected to a 1287 Electrochemical Interface coupled with a Solartron 1250 Frequency Response Analyzer. To monitor the changes in the coatings, the EIS measurements were performed after 1h and for double-layer coated samples additionally after 1, 3, 7 and 9 days. The impedance spectra of the samples were analyzed in terms of Nyquist plots.

Results and discussion

The typical SEM and CM images together with the corresponding EIS spectra obtained after 1 h exposure to Hanks solution for uncoated (reference) and double-layer coated samples are presented in FIG.1ab. From the microscopic observations it can be inferred that the polymer coating compose a smooth layer at the SS surface. The EIS measurements showed that the double-layer (silane+parylene) coating is a good corrosion protective coating on the steel surface. However, it should be mentioned here that the one-layer coatings (silane or parylene alone) did not formed a protection against corrosion. Long term corrosion experiments (9 days) for the samples covered by double-layer coatings (silane+parylene) showed that in Hanks solution



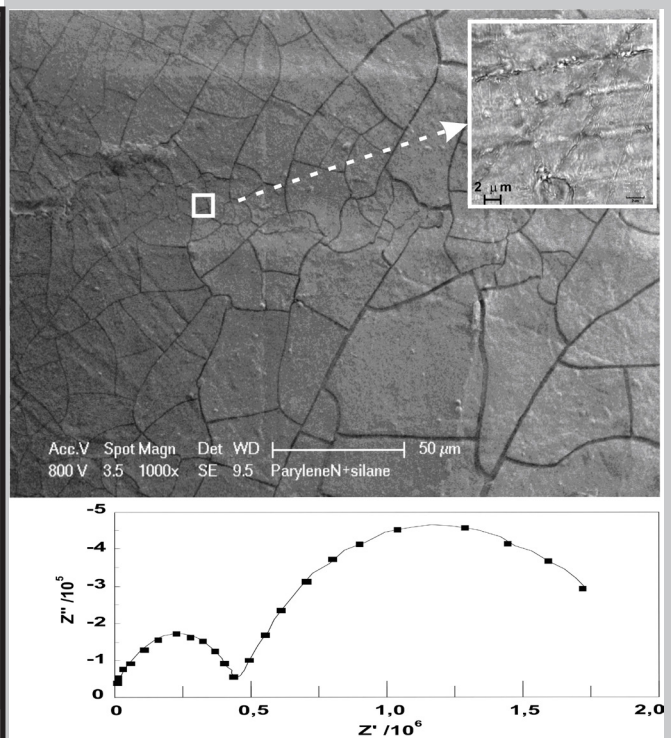
RYS.1. Diagramy Nyquista, zdjęcia SEM i CM (w dodatku) po 1 godzinie kontaktu z płynem Hanksa dla próbki stali: niepokrytej (a) pokrytej podwójną warstwą polimerową (b).

FIG.1. Nyquist plots and the corresponding SEM and CM images (inserts) after 1h exposure to Hanks solution for: uncoated (a) and double-layer (silane + parylene) coated SS surface (b).

stwa (silan+parylen) stanowi dobrą antykorozyjną powłoką ochronną. Jednocześnie należy podkreślić, że zastosowanie każdego z polimerów pojedynczo (silan lub parylen) nie prowadzi do należytego zabezpieczenia powierzchni stali implantacyjnej. Na podstawie długoterminowych eksperymentów elektrochemicznych (9 dni) można stwierdzić, że podwójna warstwa (silan+parylen) dobrze zabezpiecza powierzchnię stali przed działaniem płynu Hanksa. Jednakże dodatek nadtlenku wodoru już po jednym dniu drastycznie zmienia funkcję ochronną podwójnej warstwy polimerowej. Co prawda, początkowo, powłoka wykazuje odporność co odzwierciedla linia prosta na diagramie Nyquista, jednak po czasie 3 dni na wykresie pojawiają się dwa charakterystyczne półokręgi. Wraz ze wzrostem czasu kontaktu (7-9 dni) z płynem Hanksa z H_2O_2 średnice półokręgów stają się coraz mniejsze. Wskazuje to na spadek odporności korozyjnej powierzchni (RYS.2). Należy podkreślić, że efekt ten obserwowano jedynie w obecności nadtlenku wodoru. Obserwacje mikroskopowe pokazują, że po długim czasie kontaktu z płynem Hanksa z H_2O_2 pojawiają się wyraźne pęknięcia w podwójnej powłoce polimerowej. Na podstawie wyników eksperymentalnych zaproponowano model degradacji powłoki polimerowej, który opiera się na powstawaniu reaktywnych rodników OH^\cdot na granicy faz powierzchnia stali/powłoka polimerowa.

Wnioski

Do analizy odporności korozyjnej oraz zmian na powierzchni stali implantacyjnej 316L pokrytej powłokami polimerowymi wykorzystano pomiary elektrochemiczne i obserwacje mikroskopowe. Długoterminowe testy w sztucznych płynach fizjologicznych wykazały, że podwójna



RYS.2. Zdjęcia SEM i CM, diagramy Nyquista dla podwójnej warstwy.

FIG. 2 SEM and CM images, Nyquist plot for double layer coating after long term (9 days) EIS exposure to Hanks solution with H_2O_2 .

the protective layer still exhibits its protective function. However, in the case of Hanks solution with H_2O_2 addition, the impedance response drastically changed already after one day. Initially the coating acts like a shield and the EIS spectrum in the Nyquist plot appears like a straight line. After a longer exposure time (3 days) the straight line in Nyquist diagram transforms into two semicircles. With increased exposure time (7-9 days), the diameters of the semicircles become smaller, indicating the decrease of the corrosion resistance (FIG.2). It is worth mentioning that this effect is strongly associated with the presence of H_2O_2 in Hanks solution. The microscopic observations provide complementary information on the processes taking place in the polymer coating. As shown in FIG.2 after long term exposure to Hanks solution with H_2O_2 the cracks in the double-layer coating appeared. Basing on the experimental results the degradation mechanism of the coating, involving formation of reactive OH^\cdot radicals at the SS/polymer coating interface, can be proposed.

Conclusions

Electrochemical measurements and microscopic observations are suitable and complementary methods for investigations of the corrosion resistance and observations of the surface changes of the polymeric coating on SS implant surface. Long term exposure tests in simulated body fluid (Hanks solution) revealed that the double-layer coating can be successfully used for corrosion protection of stainless steel 316L. However, the addition of 100 mM H_2O_2 , simulating the inflammatory response of the patient organism, causes a dramatic destruction of the polymer coating. The mechanistic model involving OH^\cdot radicals was proposed for the explanation of the deterioration mechanism of the polymer coating.

powłoka polimerowa może skutecznie służyć do ochrony antykorozyjnej. Jednakże, dodatek 100 mM H₂O₂ symulujący odczyn zapalny organizmu spowodował drastyczne zniszczenie powłoki. Uzyskane wyniki doświadczalne pozwoliły na opracowanie mechanizmu degradacji warstwy polimerowej.

Podziękowania

Projekt realizowany w ramach programu Ventures Fundacji na rzecz Nauki Polskiej współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej – Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.

Acknowledgements

Project operated within the Foundation for Polish Science Ventures Programme, co-financed by the EU European Regional Development Fund.

Piśmiennictwo

References

- [1]. Donglu Shi, Introduction to Biomaterials, Tsinghua University Press, 2006.
- [2]. M. Cieslik, W. Reczynski, A. M. Janus, K. Engvall, R. B. Socha, A. Kotarba, Metal release and formation of surface precipitate at stainless steel grade 316 and Hanks solution interface - Inflammatory response and surface finishing effects, Corros. Sci., 51 (5) (2009) 1157.
- [3]. A. P. Piedade, J. Nanes, M. T. Vieira, Thin films with chemically graded functionality based on fluorine polymers and stainless steel, Acta Biomaterialia 4 (2008) 1073.
- [4]. W. Kajzer, A. Krauze, W. Walke, J. Marciniak, Corrosion behaviour of AISI 316L steel in artificial body fluids, AMME, 31 (2) (2008) 247.

AKTYWNOŚĆ PRZECIWBAKTERYJNA IN VITRO WYTWORZONYCH BIOSZKIEŁ ZAWIERAJĄCYCH SREBRO

LIDIA CIOŁEK^{1*}, JOANNA KARAŚ¹, ANDRZEJ OLSZYNA²,
EWA ZACZYŃSKA³, ANNA CZARNY³, BOGUSŁAWA ŻYWICKA⁴

¹INSTYTUT CERAMIKI I MATERIAŁÓW BUDOWLANYCH,
UL. POSTĘPU 9, 02-676 WARSZAWA,

²POLITECHNIKA WARSZAWSKA WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,
UL. WOŁOSKA 141, 02-507 WARSZAWA

³POLSKA AKADEMIA NAUK

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ,
UL. RUDOLFA WEIGLA 12, 53-114 WROCŁAW

⁴AKADEMIA MEDYCZNA WE WROCŁAWIU,
UL. PASTEUR 1, 50-361 WROCŁAW

MAILTO: BIOCERAMIKA@ICIMB.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 21-23]

Wprowadzenie

Celem przeprowadzonych badań było określenie w warunkach in vitro działania przeciwbakteryjnego bioszkieł w postaci proszków zawierających srebro. Właściwości fizykochemiczne wytworzonych metodą zol-żel bioszkieł obejmujące m.in. morfologię ziaren i półilościową mikroanalizę powierzchni zostały opisane w [1,2], natomiast wyniki badań cytotoxyczności in vitro przedstawiono w publikacji [3]. Niniejsza praca przedstawia wyniki badań in vitro aktywności przeciwbakteryjnej tych bioszkieł przeprowadzonych we współpracy z IITD PAN oraz AM we Wrocławiu.

IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SILVER- CONTAINING BIOGLASSES

LIDIA CIOŁEK^{1*}, JOANNA KARAŚ¹, ANDRZEJ OLSZYNA²,
EWA ZACZYŃSKA³, ANNA CZARNY³, BOGUSŁAWA ŻYWICKA⁴

¹INSTITUTE OF CERAMICS AND BUILDING MATERIALS,
9 POSTĘPU STREET, 02-676 WARSZAW, POLAND

²WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING,
141 WOŁOSKA STREET, 02-507 WARSZAW, POLAND

³POLISH ACADEMY OF SCIENCES,
INSTITUTE OF IMMUNOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPY,
12 RUDOLFA WEIGLA STREET, 53-114 WROCŁAW, POLAND

⁴WROCŁAW MEDICAL UNIVERSITY,
1 PASTEUR STREET, 50-361 WROCŁAW, POLAND
MAILTO: BIOCERAMIKA@ICIMB.PL

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 21-23]

Introduction

The aim of the study was to determine in vitro antimicrobial activity of bioglasses in the form of silver-containing powders. Physical and chemical properties of bioglasses produced by sol-gel method including grain morphology and surface semi-quantitative microanalysis were described in [1,2], while the results of in vitro cytotoxicity were presented in publication [3]. This paper presents the results of in vitro antimicrobial activity of these bioglasses carried out in co-operation with Institute of Immunology and Experimental Therapy and the Medical University of Wrocław.

Wytworzono cztery bioszklę z różnym udziałem srebra oraz bioszko bez udziału tego składnika jako materiał odniesienia do badań. Biorąc pod uwagę zasadnicze składniki można wśród nich wyodrębnić cztery bioszklę glinokrzemianowe i jedno wapniowokrzemianowe, co przedstawia TABELA 1. Bioszklę te otrzymano metodą zol-żel z zastosowaniem ortokrzemianu tetraetylu jako prekursora krzemionki.

Metody badań

Badania działania przeciwbakteryjnego wykonano metodą rozcieńczeń wykorzystując prehodowle testowych szczepów bakteryjnych *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* oraz drożdżaków *Candida albicans*. Nanoszono bioszklę na podłoża w stężeniu: 0,25mg/ml; 0,5mg/ml; 1,0mg/ml; 2,5mg/ml; 5,0mg/ml; 10mg/ml; 50mg/ml oraz 100mg/ml. Płytki 24-dółkowe ze szczepami bakteryjnymi inkubowano w temperaturze $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, natomiast ze szczepami drożdżaków w temperaturze $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$. Działanie wytworzonych nanoproszków w stosunku do ww szczepów określono po 18h inkubacji zliczając żywe i martwe bakterie. Kontrole

Materials

There were four bioglasses produced with different content of silver and bioglass without this component as a reference material for research. Given the essential ingredients, there can be distinguished among them four aluminosilicates and one calciumsilicate bioglasses, as shown in TABLE 1. The bioglasses were obtained by sol-gel method using tetraethyl orthosilicate as a precursor of silica.

Test methods

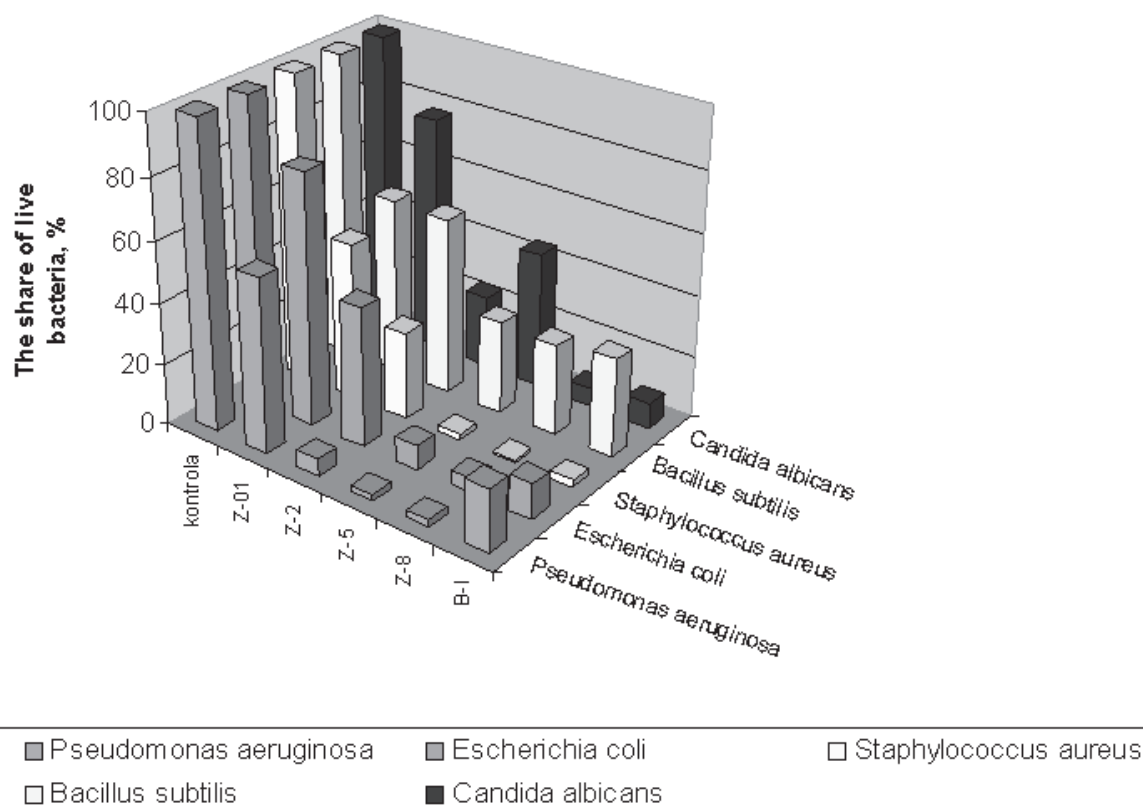
Studies of antimicrobial activity were performed by a dilution method, using precultures of test bacterial strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and the yeast *Candida albicans*. Bioglasses were deposited on substrates at a concentration of

0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5,0 mg/ml, 10mg/ml, 50mg/ml and 100mg/ml.

The 24-hole plates with the bacterial strains were incubated at the temperature $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, while the strains of yeast at a temperature of $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$. Action of nanopowders produced as compared to the above strains was identified after 18 h of incubation by counting live and dead bacteria. The broth cultures of various microorganisms without

TABELA 1. Składy tlenkowe bioszkieł.
TABLE 1. Chemical compositions of bioglasses.

Bioszko Bioglass	Zawartość tlenu [%mas.] Content wt %					Powierzchnia właściwa, [m ² /g] Specific surface, [m ² /g]
	SiO ₂	Al ₂ O ₃	CaO	P ₂ O ₅	Ag ₂ O	
Z-01	99,2	0,8	-	-	-	12,3
Z-2	98,2	0,8	-	-	1,0	4,7
Z-5	95,7	0,8	-	-	3,5	6,4
Z-8	89,0	7,5	-	-	3,5	64,9
B-I	60	-	37	2	1	78,3



RYS.1. Przeżywalność szczepów określona po 18 h przy stężeniu 2,5mg/ml bioszkieł Z-01, Z-2, Z-5, Z-8 i B-I.

FIG.1. The survival of strains determined after 18 h at a concentration of 2,5 mg/ml of bioglasses Z-01, Z-2, Z-5, Z-8 and B-I.

stanowiły hodowle bulionowe poszczególnych mikroorganizmów bez bioszkieł.

Wyniki badań

RYSUNEK 1 przedstawia wyniki działania bakteriobójczego na badane szczepy bioszkieł w postaci nanoproszków przy stężeniu 2,5 mg/ml, natomiast tabela 2 przedstawia osiągnięte wyniki przy stężeniu 100 mg/ml.

TABELA 2. Działanie bakteriobójcze nanoproszków określone po 18 h inkubacji przy stężeniu 100 mg/ml
TABLE 2. The antibacterial action of nanoparticles determined after 18 h incubation at 100 mg/ml.

Szczep Strain	Liczba żywych mikroorganizmów /ml The number of live micro-organisms/ml					
	Kontrola Control	Z-01	Z-2	Z-5	Z-8	B-I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$3,5 \times 10^8$	$9,0 \times 10^7$	< 100	< 50	< 10	0
<i>Escherichia coli</i>	$7,2 \times 10^7$	$5,7 \times 10^7$	$1,0 \times 10^4$	< 200	< 10	< 10
<i>Staphylococcus aureus</i>	$3,3 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	< 200	< 50	< 10	< 100
<i>Bacillus subtilis</i>	$3,1 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	< 100	< 100	< 100	< 100
<i>Candida albicans</i>	$7,6 \times 10^6$	$6,8 \times 10^6$	$3,9 \times 10^4$	< 10	0	0

Wnioski

1. Przeprowadzone badania aktywności przeciwbakteryjnej in vitro na wybranych szczepach bakterii i drożdżaków wytworzonych bioszkieł wykazały, że bioszkieła Z-5, Z-8 i B-I hamują w największym stopniu wzrost mikroorganizmów w badanym okresie.

2. Bioszkieła Z-5, Z-8 i B-I największą aktywność wykazały w stosunku do szczepu *Staphylococcus aureus*.

Podziękowania

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego jako projekt badawczy rozwojowy Nr R08 010 02.

bioglasses constituted the reference.

Results

FIGURE 1 shows the results of antibacterial activity of bioglasses in the form of nanoparticles on selected strains at a concentration of 2,5 mg/ml, while TABLE 2 shows the results achieved at 100 mg/ml.

Conclusions

1. The studies of in vitro antibacterial activity in selected strains of bacteria and yeast of produced bioglasses showed that bioglasses Z-5, Z-8 and B-I inhibit the growth of most micro-organisms during the tested period.

2. Bioglasses Z-5, Z-8 and B-I showed the greatest activity against strains of *Staphylococcus aureus*.

Acknowledgements

Scientific study financed from the science funds as a research and development project no. R08 010 02 by Polish Ministry of Science and Higher Education.

Piśmiennictwo

- [1]. Ciołek L., Karaś J., Olszyna A., Traczyk S. – „Nowe bioszkieła zawierające srebro”, *Inżynieria Biomateriałów*, 2008, vol. XI, 77-80, 25-27
- [2]. Ciołek L., Karaś J., Olszyna A., - „Badania właściwości fizykochemicznych bioszkieł domieszkowanych srebrem wytworzonych metodą zol-żel”, *Prace Instytutu Szkła, Ceramiki, Materiałów Ogólnotrwałych i Budowlanych* 2009, Nr 3, 15-25

References

- [3]. Lidia Ciołek, Joanna Karaś, Andrzej Olszyna, Ewa Zaczynska, Anna Czarny, Bogusława Żywicka – „In vitro studies of cytotoxicity of bioglass containing silver”, *Engineering of Biomaterials*, 2009, vol. XII, nr. 89-91, 91-93

BADANIE PRZESIAKALNOŚCI DLA KRWI USZCZELNIANYCH PROTEZ NACZYNIOWYCH

MACIEJ GAWLIKOWSKI¹, KAROLINA GORKA¹, ADAM JAROSZ¹,
ROMAN KUSTOSZ¹, MAREK KOWALCZUK², GRAŻYNA ADAMUS²

¹FUNDACJA ROZWOJU KARDIOCHIRURGII, ZABRZE

²POLSKA AKADEMIA NAUK,

CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH, ZABRZE

Streszczenie

Celem zadania badawczego była analiza przesiekalności dla krwi protez naczyniowych uszczelnianych pochodnymi polihydroksymaślanu (PHB).

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 24-25]

Materiały i metody

Materiał badawczy stanowiły protezy naczyniowe firmy BARD 004187 style 6010 o średnicy 16mm. Zastosowano następujące materiały uszczelniające oraz metody aplikacji:

- R1–proteza naczyniowa impregnowana mieszką polimerową o składzie 80% aPHB o $M_n=10000$ i 20% n-PHB o $M_n=100000$ naniesioną z roztworu.

- R2- proteza naczyniowa impregnowana a-PHB $M_n=100000$, naniesionym z roztworu.

- R3–proteza naczyniowa impregnowana mieszką polimerową o składzie 98% aPHB $M_n=100000$ i 2% n-PHB $M_n=3000$ naniesioną z roztworu.

- R4-proteza naczyniowa impregnowana naturalnym PHBH (poly-3-hydroksybutyrate-co-3hydroxyhexanoate), naniesionym z roztworu.

- EP-1-proteza naczyniowa impregnowana mieszką polimerową o składzie 80% aPHB $M_n=10000$ i 20% nPHB $M_n=100000$, naniesioną z zastosowaniem urządzenia do elektroprzędzenia.

- EP-2-proteza naczyniowa impregnowana aPHB $M_n=100000$, naniesionym z zastosowaniem elektroprzędzenia.

Do celów badawczych zostały opracowane zestawy mocujące próbkę, złożone z łączników i elementów uszczelniających (FIG.1)

Jako medium badawcze zastosowano antykoagulowaną CPDA-1 krew wieprzową. Transport krwi do laboratorium odbywał się w temperaturze 10°C. Czas potrzebny na dostarczenie krwi od momentu pozyskania krwi do momentu rozpoczęcia badania wynosił 1,5 godziny. W czasie doświadczenia w celu kontroli jakości stosowanej krwi, oznaczano podstawowe parametry morfologiczne oraz poziom wolnej

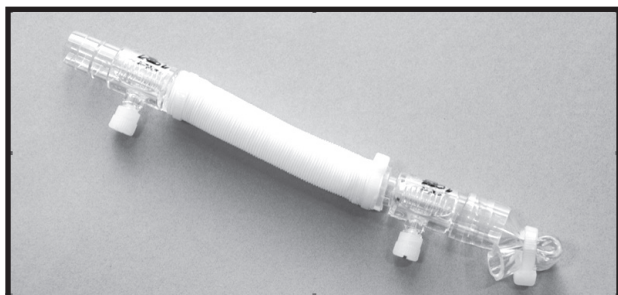


FIG.1 Próbką protezy naczyniowej wraz z elementami mocującymi i uszczelniającymi.

FIG.1 Vascular prosthesis' sample with mounting and seal elements.

INVESTIGATION OF BLOOD PERMEABILITY THROUGH SEALED VASCULAR PROSTHESIS

MACIEJ GAWLIKOWSKI¹, KAROLINA GORKA¹, ADAM JAROSZ¹,
ROMAN KUSTOSZ¹, MAREK KOWALCZUK², GRAŻYNA ADAMUS²

¹FOUNDATION OF CARDIAC SURGERY DEVELOPMENT, ZABRZE

²POLISH ACADEMY OF SCIENCES,

CENTER OF POLYMER AND CARBON MATERIALS, ZABRZE

Abstract

The aim of the investigation was blood permeability determination of vascular grafts sealed with polyhydroxybutyrate (PHB) derivatives.

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 24-25]

Materials and methods

The investigation material was BARD 004187 style 6010 vascular prosthesis with 16mm internal diameter. The following sealing's materials and methods were used:

- Polymer mixture composed of 80% aPHB $M_n=10000$ (atactic poly(3-hydroxybutyrate)) and 20% nPHB $M_n=100000$ (poly(3-hydroxybutyrate)), coating applied by dipping the graft in a polymer mixture solution. Samples marked as R1

- a-PHB $M_n=100000$, coating applied by the dipping the graft in a polymer mixture solution.. Samples marked as R2.

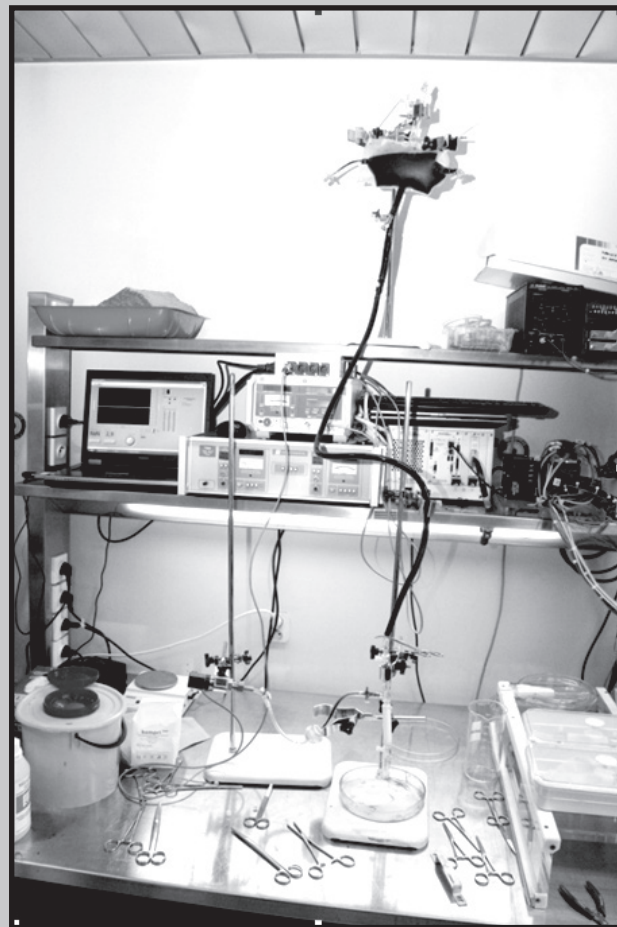


FIG.2 Stanowsisko badawcze.

FIG.2 Arrangement of laboratory stand.

hemoglobiny w osoczu. Przepiękność była badana na specjalnym stanowisku laboratoryjnym, opracowanym w celu jak najwierniejszego oddania warunków zastosowania protez naczyniowych. Test polegał na wygenerowaniu we wnętrzu próbki ciśnienia 100mmHg, w tym celu zbiornik z krwią umieszczono 1,2m powyżej badanej próbki.

Objętość krwi pozyskaną w trakcie przesączania oznaczano metodą pośrednią przez oznaczenie masy pozyskanej krwi i przeliczenie na objętość.

Wyniki

Wyniki pomiaru przepiękności poszczególnych próbek graftów naczyniowych, zostały przedstawione w TABELI poniżej oraz graficznie (FIG.3)

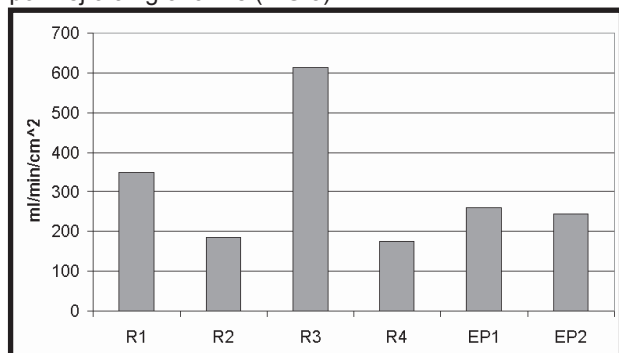


FIG.3 Porównanie przepiękności otrzymanej dla próbek protez naczyniowych.

FIG.3 Permeability comparison of different PHB derivatives coatings applied by two methods.

Dyskusja

Zastosowanie eksperymentalnej metody badawczej różni się od standardowej procedury opisanej w normie ISO 7198:1998(E), było powodowane opracowaniem warunków badania najbardziej zbliżonych do rzeczywistego zastosowania graftów naczyniowych. W czasie trwania eksperymentu poprzez analizę stężenia wolnej hemoglobiny w osoczu i stały hematokryt kontrolowano stabilność oraz jakość stosowanej krwi.

Należy podkreślić, że uzyskane wyniki przepiękności dla uszczelnionych protez naczyniowych są znacznie wyższe niż wartości deklarowane dla graftów poddanych preclotowaniu (<5ml/min/cm²). Uzyskane wyniki wskazują, że pochodne PHB i metody nanoszenia wpływają mniej lub bardziej na wzrost przepiękności uszczelnianych graftów. Przyczyna występowania tego zjawiska wymaga dalszych badań w celu wyjaśnienia.

Wnioski

- Procedura opracowana na potrzeby zadania badawczego jest odpowiednia do analizy przepiękności graftów naczyniowych w warunkach maksymalnie zbliżonych do ich rzeczywistego zastosowania.

- Przeanalizowane pochodne PHB oraz metody nanoszenia nie są odpowiednie do wytwarzania powłok uszczelniających.

- Metoda nanoszenia oraz zastosowane materiały uszczelniające powinny zostać zweryfikowane oraz ulepszone.

- Polymer mixture composed of 98% aPHB $M_n=100000$ and 2% n-PHB $M_n=3000$, coating applied by the dipping the graft in a polymer mixture solution. Samples marked as R3.

- PHBH (poly-3-hydroksybutyrate-co-3hydroxyhexanoate), coating applied by the dipping the graft in a polymer mixture solution. Samples marked as R4.

- Polymer mixture composed of 80% aPHB $M_n=100000$ and 20% n-PHB $M_n=100000$, coating applied by the electro spinning method. Samples marked as EP1.

- aPHB $M_n=100000$, coating applied by the electrospinning method. Samples marked as EP2.

Special sample sets with connection and soft ring seals were established for testing purposes (FIG.1)

Porcine blood antycoagulated with CPDA-1 was used as an operating medium. Blood transport to the laboratory was performed in temperature of 10°C. Time elapsed from blood collection to the beginning of the investigation was about 1,5h. Blood morphological parameters and stability (free hemoglobin level in blood plasma) were investigated during the test.

A special laboratory stand was developed to give back as near as possible surgical conditions (FIG.2). The test based on generating constant hydrostatic pressure of 100mmHg inside the sample, by placing the blood bag at height at 1.2m above the sample. The amount of blood leakage through the prosthesis wall was determined indirectly by weight of blood collected in Petri's dish and recalculating into corresponding value of blood volume.

Results

Results of permeability measurement for particular grafts are shown in Table below and diagram (FIG.3).

Discussion

Application of developed method different from specified in ISO 7198:1998(E) standard was caused by the intention of determining vascular graft's properties in surgical conditions. However it is necessary to point out that comparison of results archived in this work to others, obtained with different procedures, should be done very cautiously.

The stability of biological material was kept during the whole experiment. This was confirmed by unchangeable hemolysis level and constant level of hematocrit.

It is necessary to point out that the values of blood permeability of vascular grafts obtained during this work are much higher than values declared by preclotted grafts producers <5 ml/min/cm². The obtained results indicate that the PHB derivatives and the application methods effect more or less the enhancement of permeability of the sealed grafts for blood. The cause of this observable phenomenon must investigated.

Conclusions

- Research procedure assumed in this work is suitable for vascular graft's permeability determination in conditions close to targeted application area.

- PHB derivatives and the application methods are not suitable for obtaining coatings with sealing properties.

- The method and the sealing material must be verified and improved.

TABELA 1. Wyniki przepiękności dla poszczególnych próbek.

TABLE 1. Results of graft's permeability.

Próbka Sample	ml/min/cm²
R1	350,62
R2	184,23
R3	613,87
R4	175,76
EP1	258,73
EP2	244,45

OCENA OPORNOŚCI OSMOTYCZNEJ KRWINEK CZERWONYCH JAKO DODATKOWA METODA OCENY BIOZGODNOŚCI BIOMATERIAŁÓW Z KRWIĄ

ANDRZEJ JANUS*, STANISŁAW PIELKA

AKADEMIA MEDYCZNA WE WROCŁAWIU
Z-D CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA BIOMATERIAŁÓW
UL. PONIATOWSKIEGO 2, 50-326 WROCŁAW
*MAILTO: ANDJANUS@GMAIL.COM

[Inżynieria Biomateriałów, 99, (2010), 26-28]

Wstęp

Niektóre biomateriały, pomimo iż w badaniach in-vitro nie wywołują istotnego wzrostu hemolizy krwinek czerwonych, mogą wywierać wpływ na strukturę błony komórkowej erytrocytów (np. przez uwalnianie do krwi związków). Może mieć to szczególnie istotne znaczenie w grupie materiałów które są przeznaczone do bezpośredniego, długotrwałego kontaktu z krwią. Krwinki z uszkodzoną błoną komórkową, pod wpływem wielu czynników występujących w układzie in-vivo, a nie branych pod uwagę w warunkach in-vitro, mogą ulegać uszkodzeniu i hemolizie wewnątrznaczyniowej [1,2].

Prawidłowa krwinka czerwona w środowisku hipotonicznym, zanim ulegnie hemolizie, posiada zdolność do znacznego powiększenia swojej objętości. Inaczej jest w przypadku komórek o zaburzonym stosunku między objętością i powierzchnią oraz ze zmienioną strukturą błony komórkowej, na przykład przez kontakt z toksycznym materiałem. Wykazują one większą wrażliwość na stres osmotyczny, tym samym charakteryzują się zmniejszoną opornością osmotyczną. Badanie to można uznać zatem za pośrednią metodę oceny uszkodzenia struktury błony komórkowej i zaburzenia relacji objętość-powierzchnia krwinek czerwonych [3,4].

Celem pracy była ocena przydatności, niestosowanej powszechnie w badaniach biozgodności biomateriałów, laboratoryjnej metody diagnostycznej, polegającej na ocenie oporności osmotycznej krwinek czerwonych w kontakcie z różnymi biomateriałami.

Materiał i metody

Do badań wykorzystano trzy rodzaje wybranych materiałów: protezę naczyń krwionośnych DALLON H, piankę korundową oraz tworzywo kalcytowe. Przed przystąpieniem do badań przygotowano 27 szeregów piętnastu, odpowiednio podpisanych próbek. W każdym z szeregów wykonano odpowiednio roztwory chlorku sodowego, w stężeniach od 10 do 150 mmol/l.

Pierwszym etapem badania było poddanie poszczególnych materiałów, w dwóch powtórzeniach każdy, 3, 12 i 24 godzinnej inkubacji ($37 \pm 1^\circ\text{C}$) z koncentratem krwinek czerwonych (KKCz) pozbawionym kożuszka leukocytnopłytkowego. Proporcję materiału do objętości KKCz dobrano zgodnie z tablicą znormalizowanego pola powierzchni i objętości płynu ekstrakcyjnego, ujętą w normie EN ISO 10993-12:2007. Do każdego z zakresów inkubacji dołączono po trzy próby kontrolne KKCz (bez materiałów badanych). Inkubację przeprowadzono w zamkniętych probówkach

EVALUATION OF RED BLOOD CELL OSMOTIC RESISTANCE AS AN ADDITIONAL METHOD FOR ASSESSING THE BLOOD BIOCOMPATIBILITY OF BIOMATERIALS

ANDRZEJ JANUS*, STANISŁAW PIELKA

WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY
DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL SURGERY AND BIOMATERIALS
RESEARCH
2, PONIATOWSKIEGO STR., 50-326 WROCLAW, POLAND
*MAILTO: ANDJANUS@GMAIL.COM

[Engineering of Biomaterials, 99, (2010), 26-28]

Introduction

Some biomaterials, although in vitro studies do not cause a significant increase in haemolysis of red blood cells, can influence the structure of the erythrocyte membrane (for example by compounds released into the blood). This could be particularly important in a group of materials that are intended for direct, prolonged contact with blood. Cells with damaged cell membrane, under the influence of many factors in the system in vivo, not taken into account in terms of in-vitro, may be subject to damage them and intravascular haemolysis [1,2].

Healthy red blood cell in a hypotonic environment before they will haemolysis, has the capacity to significantly increase their volume. This is different for cells with impaired relationship between the volume and the surface and with the revised structure of the cell membrane, for example after contact with toxic material. They are characterized by greater sensitivity to osmotic stress, thus characterized by a reduced osmotic resistance. This test can be considered as an indirect method of assessing the damage to the structure of the cell membrane and disruption of the volume-area relationship of red blood cells [3,4].

The aim of this study was to evaluate the usefulness, not applied widely in the evaluation of biocompatibility of biomaterials, laboratory diagnostic method to investigate the assessment of red cell osmotic resistance in contact with various biomaterials.

Materials and methods

For the study used three types of selected materials: vascular prostheses DALLON H, corundum material and calcite material. Previously there were prepared 27 series with 15 signed tubes. In each of the series made the appropriate solutions of sodium chloride at concentrations from 10 to 150 mmol / l.

The first stage of the test was the incubation of various materials, each in duplicate, in 3, 12 and 24 hours ($37^\circ\text{C} \pm 1 / 98.6^\circ\text{F}$) with a concentrate of red blood cells (CRBC) without leukocytes-plate layer. Proportion of materials and CRBC volume was selected from standardized array of areas and volumes of fluid extraction, as contained in PN-EN ISO 10993-12:2009. For each of the ranges of incubation, accompanied by a check after three attempts CRBC (without the test material). Incubation was carried out in closed polypropylene tubes [5].

Osmotic resistance test was using photometric method

$$\% \text{hemolizy} = N_{\text{abs}} \cdot P1_{\text{abs}}^{-1}$$

RYS.1: Wzór do obliczania odsetka hemolizy (Nabs – wartość średniej absorbancji dla obliczanej próbki; P1abs – wartość absorbancji dla próbki nr 1 odpowiadającej 100% hemolizie).

FIG.1: Formula to calculate the percentage of haemolysis (Nabs - mean absorbance value calculated for the sample; P1abs - the value of absorbance for tube No. 1, corresponding to 100% haemolysis).

polipropylenowych [5].

Badanie oporności osmotycznej przeprowadzono fotometrycznie w oparciu o metodę Huntera w modyfikacji Daciego. Po zakończeniu każdej serii inkubacji próbki delikatnie wstrząsano i przenoszono z nich po jednej małej kropli krwi do odpowiednio podpisanych szeregów z roztworami NaCl. Następnie każdy z szeregów został poddany 30 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu inkubacji wszystkie próbki odwirowano (5' przy 3000obr/min), a następnie odczytano absorbancję ($\lambda=540\text{nm}$) supernatantów poszczególnych szeregów, względem odpowiednich supernatantów z próbki nr 15 danego szeregu (150 mmol/l NaCl) [3,6].

Na podstawie uzyskanych wartości absorbancji próbek poszczególnych szeregów obliczono odsetek hemolizy krwinek czerwonych względem pierwszej próbki każdego szeregu (odpowiadającej 100% hemolizie). Posłużono się w tym celu wzorem przedstawionym na RYSUNKU 1, a wartości średnie uzyskanych wyników, z uwzględnieniem odchyłań standardowych, przedstawiono na wykresach (RYSUNKI 3, 4 i 5).

Następnie, za pomocą wzoru przedstawionego na RYSUNKU 2, obliczono wartość stężenia NaCl oporności średniej (stężenia NaCl w którym hemolizie uległo 50% badanych krwinek). Obliczone wartości średnie, z uwzględnieniem odchyłań standardowych, przedstawiono na wykresie (RYS.6).

Wyniki

Po 3 i 12 godzinnej inkubacji materiałów z KKCz, biorąc pod uwagę odchylenia standardowe, nie zauważono istotnych zmian w przebiegu krzywych oporności w odniesieniu do prób kontrolnych. Po 24 godzinnej inkubacji zaobserwowano zwiększoną oporność osmotyczną krwinek poddanych inkubacji z tworzywem kalcytowym (wzrost odsetka hemolizy nastąpił w niższych stężeniach NaCl niż w przypadku pianki korundowej, protezy naczyniowej i próby kontrolnej). W każdym z zakresów

$$\text{oporność średnia} = H + (10W - 500) \cdot (W - N)^{-1}$$

RYS.2: Wzór do obliczania średniej oporności osmotycznej (H – największe stężenie NaCl wyrażone w mmol/l w którym hemoliza przekroczyła 50% będąc jednocześnie najbliższa wartości 50%; W - % hemolizy w próbce H; N - % hemolizy w próbce znajdującej się obok próbki H, w której hemoliza ma wartość mniejszą niż 50% będąc jednocześnie najbliższa wartości 50%).

FIG.2: Formula to calculate the mean osmotic resistance (H - the largest concentration of NaCl expressed in mmol/l which exceeded 50% haemolysis while being closest to the value of 50%; W - % haemolysis in the sample H; N - % haemolysis in the sample next to the H tube which haemolysis value of less than 50% while being the closest value of 50%).

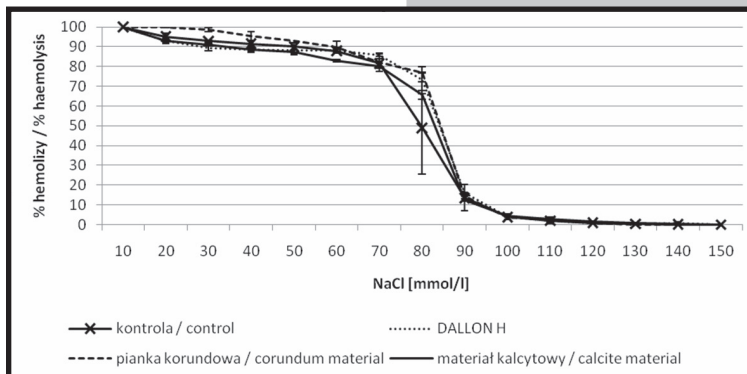
based on the Hunter's test with modification of Daci. After each series of the incubation tube was carefully shaken and transferred them (in the form of small drops of blood) to the right signed series of NaCl solutions. Then each series was incubated over 30 minute at room temperature. After the incubation all tubes were centrifuged (5min at 3000 t/min), and then read the absorbance ($\lambda = 540\text{nm}$) supernatants of individual series, relative to the corresponding supernatants from the tube no 15 of the series (150 mmol/l NaCl) [3,6].

On the basis of absorbance values of individual series of samples was calculated percentage of haemolysis of red blood cells, against the first sample of each series (corresponding to 100% haemolysis). We used a model showed in FIGURE 1. The average values of the results obtained and the standard deviations are presented in graphs (FIGURES 3, 4 and 5).

Next calculated the concentration of NaCl average resistance (the mean concentration of NaCl in which 50% of red blood cells haemolysis). We used a model showed in FIGURE 2. The average values of the results obtained and the standard deviations are presented in graphs (FIGURE 6).

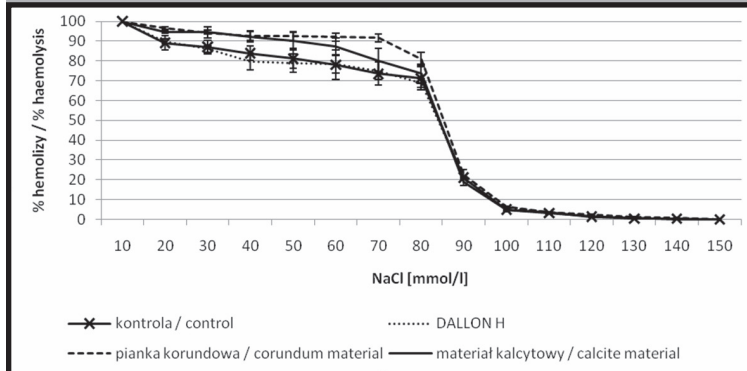
Results

After 3 and 12 hours of biomaterials incubation with CRBC, taking into account the standard deviation, not observed significant changes in the resistance curves in relation to control samples. After 24 hours of incubation was observed an increased osmotic resistance of cells that were incubated with a calcite material (increase in the percentage of haemolysis occurred in lower concentrations of NaCl than in the case of corundum material, vascular graft and



RYS.3: Krzywe oporności osmotycznych po 3 godzinnej inkubacji.

FIG.3: Osmotic resistance curves after 3 hours incubation.



RYS.4: Krzywe oporności osmotycznych po 12 godzinnej inkubacji.

FIG.4: Osmotic resistance curves after 12 hours incubation.

inkubacji, poza 24 godzinną inkubacją tworzywa kalcytowego, wszystkie inne badane materiały charakteryzowały się zbliżoną wartością średniej oporności osmotycznej, nie odbiegając jednocześnie od wartości obliczonych dla prób kontrolnych. Tworzywo kalcytowe po dobowej inkubacji z KKCz wywołało obniżenie wartości średniej oporności osmotycznej krwinek czerwonych.

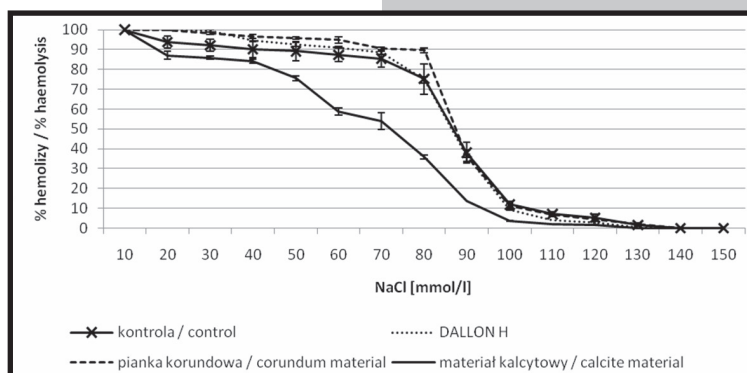
Wnioski

Przeprowadzone badania miały ocenić przydatność oznaczania oporności osmotycznej krwinek czerwonych przy ocenie biogodności materiałów z krwią. Otrzymane wyniki jednoznacznie wskazały, że proteza naczyniowa DALLON H, pianka korundowa oraz tworzywo kalcytowe, w odniesieniu do prób kontrolnych, nie wywołują istotnych zmian oporności osmotycznej zarówno po 3 jak i 12 godzinnej inkubacji. Proteza naczyniowa i materiał korundowy nie wykazały również zmian w oporności erytrocytów po 24 godzinnej inkubacji. Wyjątkiem okazało się tworzywo kalcytowe, które po 24 godzinnej inkubacji z krwią spowodowało wyraźne zwiększenie oporności osmotycznej krwinek czerwonych.

Zastosowana metoda badawcza, łącznie z etapem przygotowania prób badanych, jest prosta i stosunkowo tania w przeprowadzeniu, jednak dość pracochłonna. Uzyskane wyniki są czytelne i umożliwiają w prosty sposób porównanie między sobą zarówno różnych materiałów badanych jak i rezultatów otrzymanych dla jednego materiału po różnym czasie inkubacji z krwią. Wszystko te cechy pozwalają na postawienie wniosku, że metoda oceniająca oporność osmotyczną krwinek czerwonych po kontakcie z biomateriałami, może być w niektórych przypadkach cennym badaniem uzupełniającym. Szczególnie istotne znaczenie może mieć dla materiałów przeznaczonych do bezpośredniego, długotrwałego kontaktu z krwią, które w standardowych badaniach biogodności nie wykazały hemolizy w warunkach in-vitro, a wskazana jest ocena wpływu materiału na błonę komórkową erytrocytów.

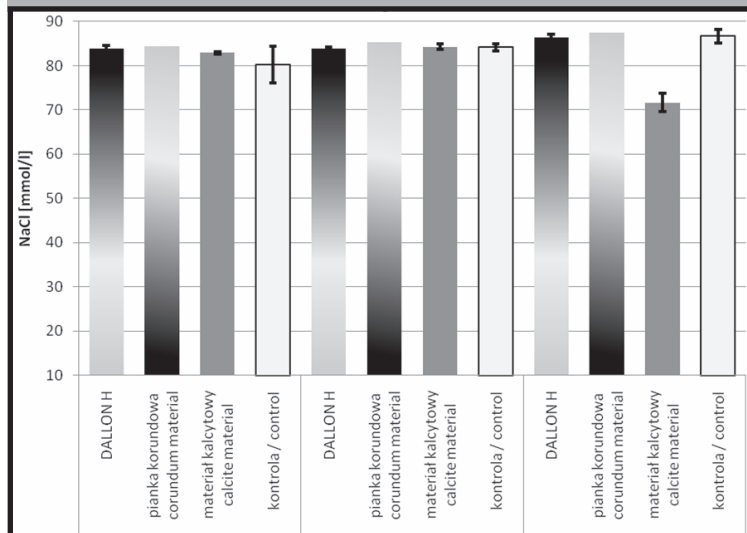
Piśmiennictwo

- [1] M. Szymonowicz, St. Pielka i inni, Study of the haemolytic action of selected carbon materials, *Engineering of Biomaterials*, 77-80, 2008, 21-22;
- [2] St. Błażewicz, L. Stoch, *Biomateriały (w:) Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna, t. IV pod red. M. Nałęcza, Akademicka Oficyna Wydawnicza Exit, Warszawa 2003, 425-452;*
- [3] B. Mariańska, J. Fabiańska-Mitek, *Badania laboratoryjne w hematologii*, PZWL, Warszawa 2006, 131-133;



RYS.5. Krzywe oporności osmotycznych po 24 godzinnej inkubacji.

FIG.5. Osmotic resistance curves after 24 hours incubation.



RYS.6: Wartości średnich oporności osmotycznych.

FIG.6: Average value of osmotic resistance.

the control sample). For each range of incubation, in addition to 24 hour incubation calcite material, all other test materials were characterized by a similar value of the average osmotic resistance, while not straying from the values calculated for control samples. Calcite material after 24 hours incubation with CRBC caused a reduction of the average osmotic resistance of red blood cells.

Conclusions

The study was to evaluate the usefulness of the test red blood cell osmotic resistance in evaluating the blood biocompatibility of materials. The results clearly indicated that DALLON H vascular prosthesis, the corundum material and calcite material, compared with attempts to control, do not cause significant changes in osmotic resistance, both at 3 and 12 hours of incubation. Vascular prosthesis and corundum material showed no changes in erythrocyte resistance after 24 hours

incubation too. The exception proved to be calcite material - after 24 hours incubation with the blood caused an increase of resistance osmotic red blood cells.

The applied research method and stage of preparation of samples, is simple and relatively cheap to carry out, but quite laborious. The results are clear and allow you to easily comparison between both the different materials and the results obtained for one material at different times of incubation with blood. All these features allow us to make a conclusion that the method of evaluating osmotic resistance of red blood cells after contact with biomaterials, may be in some cases a valuable complementary study. Particularly important may be significant for materials intended for direct, prolonged contact with blood, which in standard biocompatibility studies showed no haemolysis on in vitro tests, and it is desirable to assess the impact of material on the cell membrane of erythrocytes.

References

- [4] M. Kafka, T. Yermiahu, The effect of EDTA as an anticoagulant on the osmotic fragility of erythrocytes, *Clinical and Laboratory Haematology*, 20, 1998, 213-216;
- [5] Biologiczna ocena wyrobów medycznych część 12: przygotowanie próbki i materiały odniesienia, PN-EN ISO 10993-12, 2009, 10-11;
- [6] H. Bomski, *Podstawowe laboratoryjne badania hematologiczne*, PZWL 1989, 180-183;

BIOCERAMIKA OPARTA NA TiO_2 – WŁAŚCIWOŚCI FIZYCZNE TWORZYW KOMPOZYTOWYCH TiO_2/HAp

SŁAWOMIR MICHAŁOWSKI, ZBIGNIEW JAEGERMANN

ZAKŁAD BIOCERAMIKI INSTYTUTU CERAMIKI I MATERIAŁÓW BUDOW-
LANYCH W WARSZAWIE

[Inżynieria Biomateriałów, 99, (2010), 29-31]

Wstęp

Tytan i jego stopy są szeroko stosowane w praktyce chirurgicznej jako jeden z podstawowych materiałów do wytwarzania elementów protez stawowych, stabilizatorów kości, śrub, gwoździ i drutu. Kluczową rolę w biogodności implantów metalowych opartych na tytanie pełni powierzchniowa warstwa TiO_2 . Fakt ten skłonił autorów do przeprowadzenia badań mających na celu ocenę przydatności ceramiki opartej na TiO_2 do wypełniania ubytków kostnych. Ponieważ tlenek tytanu nie posiada zdolności do stymulowania odbudowy tkanki kostnej, skupiono się na pracach badawczych nad modyfikacją powierzchni ceramiki opartej na TiO_2 w kierunku poprawy jej osteoinduktywności. Pierwszym etapem prac są badania tworzywa TiO_2 domieszkowanego objętościowo hydroksyapatytem (HAp).

Materiały i metody

TABELA 1. Składy surowcowe tworzyw.
TABLE 1. Compositions of tested materials.

Surowiec Raw material	Skład %wag Compositions wt%		
	„TH0”	„TH10”	„TH20”
TiO_2 - Tlenek tytanu Titanium oxide	100	90	80
HAp – hydroksyapatyt hydroxyapatite	0	10	20

W ramach niniejszej pracy przeprowadzono badania tworzyw na osnowie TiO_2 (Sigma –Aldrich) bez dodatku oraz z dodatkiem 10 i 20%wag. hydroksyapatytu (Chema-Elektromet) (TABELA 1). Zbadano wpływ temperatury wypalania i ilości dodatku HAp na podstawowe właściwości fizyczne i mikrostrukturę tworzyw TiO_2/HAp . Próbkę do badań formowano z granulatu półsuchych metodą prasowania jednoosiowego dwustronnego. Wyprasowane kształtki w formie belek wypalano w różnych temperaturach końcowych od 1175 do 1325°C. Gęstość pozorną oznaczono metodą geometryczną, natomiast gęstość względną wyliczono w odniesieniu do gęstości rentgenowskich TiO_2 –4,25 g/cm³ [1] i HAp–3,156 g/cm³ [2]. Ocenę wytrzymałości mechanicznej przeprowadzono na podstawie testu zginania trójpunktowego. Właściwości surowców wyjściowych zamieszczono w TABELI 2, a zależności gęstości względnej i wytrzymałości na zginanie od temperatury wypalania przedstawiono na RYSUNKACH 1 i 2.

TITANIA-BASED BIOCERAMICS – PHYSICAL PROPERTIES OF TiO_2/HAp COMPOSITE

SŁAWOMIR MICHAŁOWSKI, ZBIGNIEW JAEGERMANN

DEPARTMENT OF BIOCERAMICS, INSTITUTE OF CERAMICS AND BUILDING MATERIALS IN WARSAW

[Engineering of Biomaterials, 99, (2010), 29-31]

Introduction

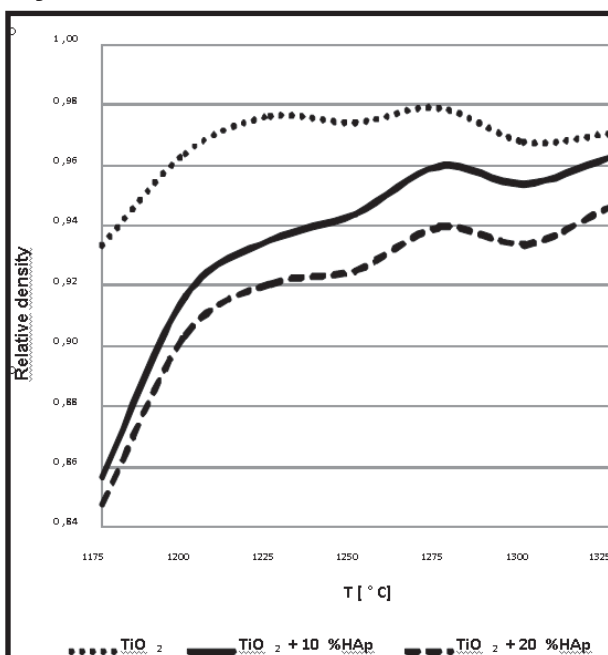
Titanium and its alloys are widely used in surgical practice as one of the basic materials for manufacturing bone stabilizers, wires, screws, nails and elements of joints endoprotheses. This is a ceramic surface layer of TiO_2 which is considered to play an important role in a biocompatibility of Ti-based metallic implants. Thus it seems justified to take into account titanium dioxide (titania) as the material for filling bone defects. However, TiO_2 has no ability to stimulate bone reconstruction. So the authors are working on the modification of TiO_2 bioceramic toward its osteoinductivity. The current study was focused on the titania with volumetric addition of hydroxyapatite powder.

Materials and methods

TABELA 2. Właściwości proszków surowców
TABLE 2. Properties of raw materials.

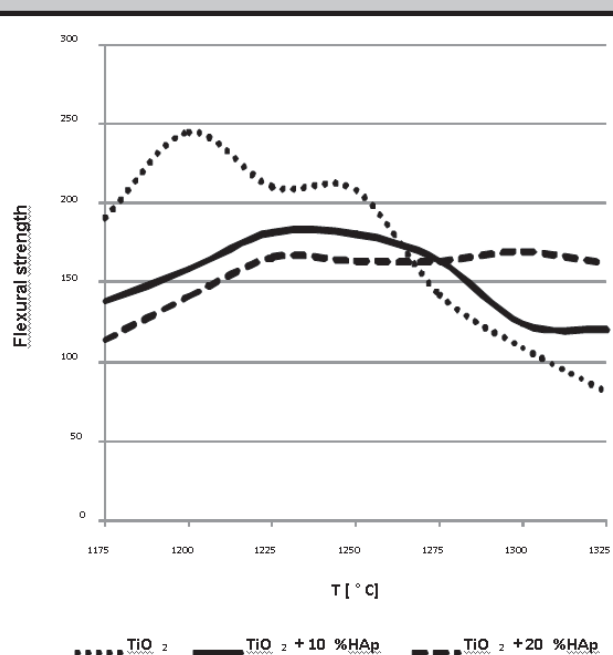
Rodzaj surowca Type of the raw material		
	Proszek TiO_2 TiO_2 powder	Proszek HAp HAp powder
Analiza uziarnienia – metoda laserowa Grain size analysis – LALLS method		
d(0,1)	0,987 μm	1,165 μm
d(0,5)	2,512 μm	14,585 μm
d(0,9)	6,884 μm	41,958 μm
Analiza chemiczna WD-XRF Chemical analysis – WD-XRF method		
TiO_2	99,715 %	-
CaO	-	59,577 %
P_2O_5	-	40,199 %
others	0,285 %	0,224 %

Three kinds of materials: based on TiO_2 (Sigma-Aldrich) and TiO_2 with 10 and 20 wt% of hydroxyapatite HAp (Chema-Elektromet) were evaluated within the research (TABLE 1). The influence of composition and sintering temperature on materials basic properties were evaluated. Testing samples were formed by uniaxial pressing and sintered in temperatures of 1175÷1325°C. Apparent density was determined by geometrical method. Relative density and total porosity were calculated on the basis of theoretical densities of TiO_2 –4,25 g/cm³ [1] and HAp–3,156 g/cm³ [2]. Mechanical properties were evaluated on the basis of flexural tests. Selected properties of raw materials were placed in TABLE 2. Results of average values of relative density, total porosity and flexural strength are shown on FIGURES 1÷2.



RYS.1. Wykres zależności gęstości względnej od temperatury wypalania tworzyw.

FIG.1. Relative density vs sintering temperature of the materials.



RYS.2. Wykres zależności wytrzymałości na zginanie od temperatury wypalania tworzyw.

FIG.2. Flexural strength vs sintering temperature of the materials.

W przypadku tworzyw na osnowie TiO₂ uzyskano maksymalnie spieczone próbki w temperaturze wypalania 1275°C a ich maksymalną wytrzymałość na zginanie osiągnięto dla próbek wypalonych w temperaturze 1200°C. Po wprowadzeniu dodatku HAp, wartości wytrzymałości na zginanie uległy zmniejszeniu wraz ze wzrostem ilości dodatku HAp (RYS.2). Dla tej grupy tworzyw wartości gęstości względnej rosły ze wzrostem temperatury, aby w zakresie 1275÷1325°C osiągnąć wartości maksymalne.

Na RYSUNKU 3 zamieszczono obrazy mikrostruktur powierzchni przełomów tworzyw. Dla tworzywa TH0 widoczne są wyraźne granice ziaren, co świadczy o przełamie po granicach ziaren. Wielkość porów o charakterze międzyziarnowym waha się w granicach kilku mikrometrów. Wprowadzenie dodatku HAp spowodowało wyraźną zmianę rodzaju przełamu próbek oraz zmianę charakteru porowatości - oprócz mikroporów międzyziarnowych pojawiają się nanopory sferyczne, charakterystyczne dla spiekania z udziałem fazy ciekłej.

Podsumowanie

Analiza wyników badań pokazuje, że zarówno skład chemiczny jak i obróbka termiczna mają wpływ na właściwości fizyczne i mechaniczne, a także mikrostrukturę tworzyw na bazie TiO₂.

W przypadku czystego tworzywa TiO₂ maksymalne zagęszczenie próbki (gęstość pozorna - 4,18g/cm³, gęstość względna - 0,98) uzyskano w temperaturze spiekania 1275°C. Wytrzymałość na zginanie osiągnęła maksymalną wartość (244 MPa) dla tworzywa wypalonego w temperaturze 1200°C. Po wprowadzeniu do tworzyw dodatku HAp, wytrzymałość na zginanie zmniejszyła się do ok. 180 MPa dla dodatku 10% HAp i ok. 170 MPa dla dodatku 20% HAp. Dla tworzyw z dodatkiem HAp gęstości pozorne zmniejszały się wraz ze wzrostem ilości dodatku. Dla 10% HAp maksymalna gęstość względna przekroczyła wartość 0,96, a dla 20% HAp - przekroczyła wartość 0,94.

For the samples of pure titania the highest density was obtained using sintering temperature of 1275°C, and the highest flexural strength - of 1200°C. In titania with HAp powder addition flexural strength clearly decreased with the increase of the content of HAp. For TiO₂/HAp composites the density was increasing with sintering temperature up to 1275°C when it reached its maximum - but differences among densities of samples were not significant considering used testing method.

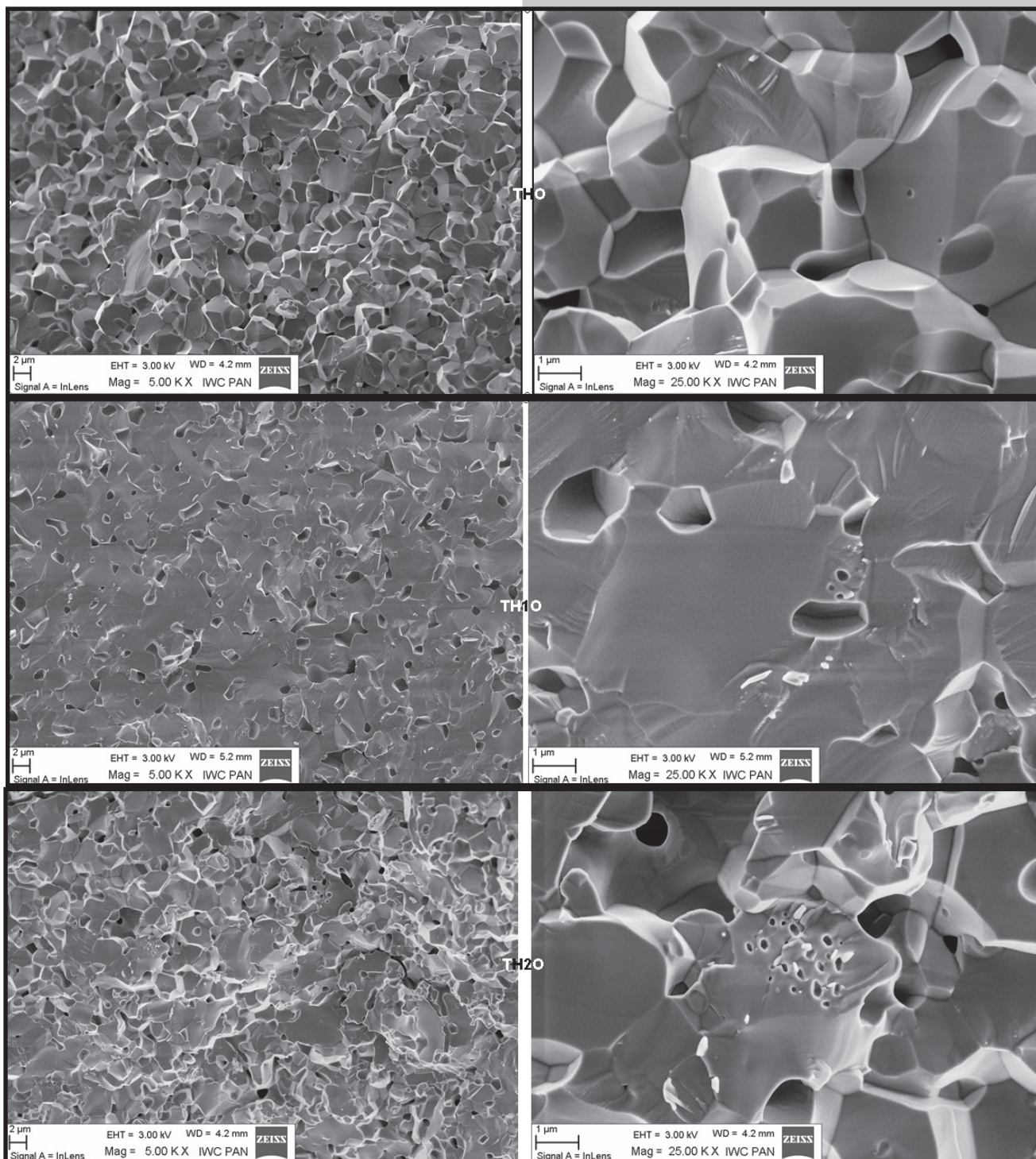
Very similar tendency was observed for the relation between the sintering temperature vs. total porosity.

On FIGURE 3 microscopic images of fracture surface of the materials were shown. In the pure titania samples grain boundaries are clear as the fracture follows the grain boundaries. Estimated size of intergranular pores is about 1 µm. In TiO₂/HAp composite samples the different character of fracture (through the grains) and porosity can be observed. Apart from intergranular pores, spherical nanopores are visible as well. Their presence is characteristic for liquid phase sintering.

Summary

Analysis of the results showed that both chemical composition and thermal treatment have direct impact on physical and mechanical properties as well as on microstructure of titanium dioxide based materials.

In pure titania samples the highest density values (apparent - 4,18 g/cm³, relative 98%) and the lowest total porosity (2,12%) were achieved when the sintering temperature of 1275°C were applied. The flexural strength reaches the highest value (244 MPa) in the sample sintered in 1200°C. In TiO₂/HAp samples the flexural strength decreases to about 180 MPa for 10% of HAp and to about 170 MPa for 20% of HAp. In composite materials the density was decreasing with the increase of HAp content. In TH10 samples the relative density achieves the value of 0,96 and for TH20 it achieves the value of 0,94.



RYS.3. Obrazy SEM powierzchni przełamów badanych tworzyw.
FIG.3. SEM images of fractured surfaces of the materials

Kontynuowane będą badania mikrostruktury materiałów, w tym pochodzenie ujawnionych w obrazach mikroskopowych nanoporów.

Podziękowania

Praca finansowana przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach grantu nr R08 003 03.

Piśmiennictwo

[1]. Baza ICDD (International Centre for Diffraction Data), 12 Campus Boulevard, Newtown Square, PA 19073-3273 USA

The microstructure of TiO_2/HAp materials will be the subject of our further studies especially in the aspect of the presents of spherical nanopores in composite material.

Acknowledgements

This work is financed by Polish Ministry of Science and Higher Education (grant nr R08 003 03).

References

[2]. Ślósarczyk A.: Bioceramika hydroksyapatytowa. Ceramika 51, PTCer, Kraków 1997, 22

WPŁYW PASYWACJI NA ODPORNOŚĆ KOROZYJNĄ STOPU NiTi

MARCIN KACZMAREK

POLITECHNIKA ŚLĄSKA,
INSTYTUT MATERIAŁÓW INŻYNIERSKICH I BIOMEDYCZNYCH
UL. KONARSKIEGO 18A, 44-100 GLIWICE
MAILTO:MARCIN.KACZMAREK@POLSL.PL

Streszczenie

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu różnych metod pasywacji powierzchni stopu NiTi na odporność korozyjną. Analizowano dwa warianty pasywacji powierzchni: chemiczną oraz elektrochemiczną. Dla każdego z zaproponowanych wariantów zastosowano różne kąpiele oraz oceniano wpływ parametrów procesów na odporność korozyjną.

Słowa kluczowe: biomateriały, stopy z pamięcią kształtu, odporność korozyjna, pasywacja
[Inżynieria Biomateriałów, 99, (2010), 32-34]

Wprowadzenie

Zastosowanie stopów z pamięcią kształtu w medycynie warunkowane jest zapewnieniem odpowiedniej odporności korozyjnej, która w głównej mierze uzyskiwana jest dzięki modyfikacji powierzchni wyjściowej stopów, zapewniającej wytworzenie szczelnej warstwy pasywnej. Najczęściej stosowaną oraz najłatwiejszą metodą modyfikacji powierzchni stopu NiTi jest utlenianie w różnych mediach. Otrzymane cienkie warstwy tlenkowe, z dominującym tlenkiem TiO_2 , utlenione w powietrzu posiadają różne kolory, grubości oraz różną adhezję. Jednakże podstawowymi wadami tak przygotowanych powierzchni jest fakt, że poza TiO_2 znajdują się tam inne tlenki Ti i Ni jak również atomowy Ni. W temperaturze pokojowej utlenianie tytanu i niklu nie zachodzi do końca. W wysokiej temperaturze składniki stopu ujawniają tendencję do segregacji i formowania niejednorodnej powierzchni zawierającą mieszaninę różnych tlenków [1]. Wysoka temperatura utleniania również powoduje formowanie się na powierzchni warstw wzbogaconych w atomowy nikiel [1, 2]. Takie warstwy powierzchniowe są źródłem niklu, który potencjalnie może zostać uwolniony do środowiska organizmu [3].

W przypadku, gdy skomplikowane kształty przedmiotu lub duża twardość materiału utrudniają lub w ogóle uniemożliwiają prowadzenie polerowania mechanicznego, pasywację powierzchni przeprowadza się z wykorzystaniem metod chemicznych lub elektrochemicznych.

Materiały i metody

Do badań wykorzystano stop NiTi w stanie nadsprężystym produkcji firmy SAES Memry. Skład chemiczny stopu wykorzystanego do badań spełniał zalecenia normy ASTM F 2063. Badania przeprowadzone zostały na próbkach płaskich ($10 \times 10 \times 1$ mm) o powierzchniach polerowanych elektrolitycznie. W celu określenia wpływu różnych metod oraz parametrów procesów pasywacji powierzchni na odporność korozyjną stopu NiTi, przeprowadzono obróbkę powierzchniową, której parametry przedstawione zostały w TABELI 1.

INFLUENCE OF PASSIVATION ON CORROSION RESISTANCE OF NiTi ALLOY

MARCIN KACZMAREK

SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
INSTITUTE OF ENGINEERING MATERIALS AND BIOMATERIALS,
18A KONARSKIEGO STREET, 44-100 GLIWICE, POLAND
MAILTO:MARCIN.KACZMAREK@POLSL.PL

Abstract

The aim of the research was determination of influence of different passivation methods of NiTi alloy on corrosion resistance. Two variants of passivation were analyzed: chemical and electrochemical. For each of the proposed variant different baths and parameters were applied.

Keywords: biomaterials, shape memory alloys, corrosion resistance, passivation
[Engineering of Biomaterials, 99, (2010), 32-34]

Introduction

Application of shape memory alloys in medicine is conditioned by appropriate corrosion resistance, mostly obtained in the way surface modification that ensures formation of dense passive layers. The most common and the easiest way of the surface modification is oxidation in diverse media. The obtained thin oxide layers, consisted mostly of TiO_2 , oxidized in air have different colors, thickness and adhesion. However, the main disadvantages of these surfaces is the fact that except TiO_2 , other Ti and Ni oxides as well as elemental Ni are present on the surface. At room temperature oxidation of Ti and Ni is not completed. At high temperatures, the components of the alloy show a tendency toward segregation and formation of non-homogeneous surfaces with a mixture of different oxides [1]. Furthermore, a high temperature oxidation causes formation of surface layer enriched with elemental Ni [1,2]. This chemical element is known to be allergenic and toxic, though essential for the human body [3].

In the cases when complex shapes of an implant or hardness of the material do not allow to carry out mechanical polishing, the surface treatment is carried out by passivation realized with the use of chemical or electrochemical methods.

Materials and methods

The research was carried out on superelastic NiTi alloy manufactured by SAES Memry. Chemical composition of the alloy fulfilled requirements covered in the ASTM F 2063 standard. The research was carried out on electropolished flat samples ($10 \times 10 \times 1$ mm). In order to evaluate the influence of different methods and parameters of passivation on corrosion resistance of NiTi alloy, the following surface treatment was applied – TABLE 1.

The electrochemical tests of the investigated alloy were performed with the use of a potentiodynamic method by recording of anodic polarization curves. The tests were carried out in Ringer's physiological solution at the temperature $37 \pm 1^\circ C$. In the tests the scan rate was equal to 1 mV/sec. The PGP 201 potentiostat with the software for electrochemical tests was applied. The saturated calomel

TABELA 1. Skład chemiczny kąpeli oraz parametry procesu pasywacji
TABLE 1. Chemical composition of the baths and passivation parameters

Rodzaj pasywacji Passivation type	Skład chemiczny kąpeli Chemical composition of the baths	Czas, Time, [min.]	Temp., [°C]	Potencjał Potential [V]
Chemiczna Chemical	H ₂ O	60	wrzenia	
	NaNO ₂ (50g/dm ³)/ NaNO ₃ (50g/dm ³)	60	wrzenia	
	HNO ₃ , 1:1	60	wrzenia	
	CrO ₃ , 100 g/dm ³	60	wrzenia	
	Sterylizacja w parze wodnej Steam sterilization	30	120	
Elektrochemiczna Electrochemical	H ₂ SO ₄ , 1:1	3 - 20	10 - 30	25
	H ₃ PO ₄ , stęż.	3 - 20	10 - 30	25
	CrO ₃ , 100 g/dm ³	2 - 5	10 - 30	25
	NaNO ₂ (50g/dm ³), NaNO ₃ (50g/dm ³)	3 - 20	5 - 25	25

Badania odporności korozyjnej analizowanego stopu przeprowadzono w roztworze fizjologicznym Ringera z wykorzystaniem metody potencjodynamicznej w oparciu o rejestrację krzywych polaryzacji anodowej. Badania odporności na korozję wżerową były podzielone na dwa etapy. Pierwszy etap odbywał się w warunkach bezprądowych i polegał na ustaleniu potencjału korozyjnego E_{kor} . Ustalenie potencjału następowało w czasie 120 min. Drugim etapem była rejestracja krzywych polaryzacji anodowej prowadzona ze stałą szybkością zmian potencjału wynoszącą 1mV/s. Badania przeprowadzono w temperaturze $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Elektrode odniesienia stanowiła nasycona elektroda kalomelowa (NEK). Jako elektroda pomocnicza zastosowana została elektroda platynowa.

Wyniki i dyskusja

Badania odporności korozyjnej stopu NiTi przeprowadzone w płynie fizjologicznym Ringera wykazały, iż zaproponowane metody obróbki powierzchniowej zapewniają dobrą odporność na korozję wżerową – TABELA 2. Jednakże w wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że najlepsze efekty uzyskuje się dla zabiegów przeprowadzanych z wykorzystaniem metod chemicznych. Zastosowanie metod elektrochemicznych powoduje, iż na powierzchni pojawiają się lokalne, niejednorodne przebarwienia oraz wytrawienia.

Dla wszystkich analizowanych wariantów pasywacji uzyskano zbliżone wartości potencjałów transpasywacji. Średnie wartości potencjału transpasywacji wynosiły $E_{trans}=1397$ mV. Różnice pomiędzy analizowanymi wariantami obserwowane były natomiast dla potencjałów

electrode (SCE) was applied as the reference electrode and the auxiliary electrode was a platinum foil. The exposed area of the specimen was equal to 1 cm². The scanning direction was reversed when the anodic current density reached 1 mA/cm².

Results and discussions

Corrosion tests of the NiTi alloy, carried out in the Ringer's physiological solution, showed that the proposed surface treatment ensure good pitting corrosion resistance – TABLE 2. However, in the course of the work it was shown that the best results are obtained for treatment realized with the use of chemical methods. Application of the electrochemical methods caused local colorings and etchings of the surface.

For all the analyzed variants of passivation, similar results of transpassivation potentials were obtained. Average values of the transpassivation potential were equal to $E_{trans}=1397$ mV. However, differences between the analyzed variants were observed in corrosion potentials as well as corrosion currents. For the chemically passivated samples the average values of the corrosion potentials were equal to $E_{cor}=150$ mV but for the electrochemically treated samples the corrosion potentials were lower and equal to $E_{cor}=-88$ mV. For chemically and electrochemically passivated samples, the average values of the corrosion current density were equal to $i_{cor}=231$ nA/cm² oraz $i_{cor}=223$ nA/cm² respectively.

TABELA 2. Wyniki badań korozyjnych stopu NiTi po różnych zabiegach pasywacji.
TABLE 2. Results of the corrosion tests of passivated NiTi alloy.

Rodzaj pasywacji Passivation type	Skład chemiczny kąpeli Chemical composition of the baths	E_{cor} , [mV]	E_{trans} , [mV]	i_{cor} , [nA/cm ²]
Chemiczna Chemical	H ₂ O	167	1387	198
	NaNO ₂ (50g/dm ³)/ NaNO ₃ (50g/dm ³)	24	1318	235
	HNO ₃ , 1:1	189	1425	317
	CrO ₃ , 100 g/dm ³	158	1388	178
	Sterylizacja w parze wodnej Steam sterilization	211	1476	229
Elektrochemiczna Electrochemical	H ₂ SO ₄ , 1:1	-167	1375	118
	H ₃ PO ₄ , stęż.	-142	1457	165
	CrO ₃ , 100 g/dm ³	25	1398	347
	NaNO ₂ (50g/dm ³), NaNO ₃ (50g/dm ³)	-68	1347	263

korozyjnych oraz prądów korozyjnych. Dla próbek poddanych pasywacji chemicznej średnie wartości potencjałów korozyjnych wynosiły $E_{cor}=150\text{mV}$, natomiast dla próbek pasywowanych elektrochemicznie były niższe i wynosiły $E_{cor}=-88\text{ mV}$. Natomiast dla próbek pasywowanych chemicznie oraz elektrochemicznie średnie wartości gęstości prądu korozyjnego wynosiły odpowiednio $i_{cor}=231\text{ nA/cm}^2$ oraz $i_{cor}=223\text{ nA/cm}^2$.

Wnioski

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na możliwość zastosowania zabiegów pasywacji do uszlachetniania powierzchni implantatów ze stopów NiTi. Modyfikacja zastosowanych parametrów procesów pasywacji, zarówno chemicznej, jak również elektrochemicznej nie wpływa istotnie na odporność korozyjną badanego stopu. Z uwagi na łatwość obróbki oraz ze względu na uzyskiwaną jakość powierzchni po obróbce zaleca się przeprowadzenie procesu pasywacji metodami chemicznymi.

Podziękowania

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2010-2012 jako projekt badawczy N N507 464538.

Conclusions

The results of the research showed that the proposed passivation methods can be applied as surface treatment of implants made of NiTi alloys. Modification of the applied parameters of passivation, both chemical and electrochemical, does not significantly influence the corrosion resistance of the investigated alloy. Due to the ease of the surface treatment and the obtained surface quality, passivation of the NiTi alloy should be carried out with the use of chemical methods.

Acknowledgements

The work was financially supported by Ministry of Science and Higher Education from the funds in the years 2010 - 2012 as the research grant N N507 464538.

Piśmiennictwo

References

- [1] V. Chuprina: Examination of the process of oxidation of titanium nickelide, Powder metallurgy and metal ceramics. 28(4) (1989), 310 - 314.
- [2] C. Chan, C. Trigwell, T. Duerig: Oxidation of an NiTi alloy, Surface and Interface Analysis. 15 (1990), 349 - 354.
- [3] S. A. Shabalovskaya: Surface, corrosion and biocompatibility aspects of Nitinol as an implant material, Bio-Medical and Engineering, 12, (2002).

OCENA WIĄZANIA ANTYBIOTYKÓW FLUOROCHINOLONOWYCH Z PROTEZĄ NACZYNIOWĄ

DOROTA KOWALCZUK^{*1}, GRAŻYNA GINALSKA², MAŁGORZATA MIAZGA-KARSKA²

¹KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII LEKÓW,
UNIwersytet Medyczny w Lublinie,
UL. JACZEWSKIEGO 4,
20-090 LUBLIN, POLSKA

²KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII I BIOTECHNOLOGII,
UNIwersytet Medyczny w Lublinie,
UL. CHODZKI 1, 20-093 LUBLIN, POLSKA

Abstrakt

Przeciwbakteryjną protezę naczyniową otrzymano przez kowalencyjne wiązanie sparfloksacyiny (SPA) lub tosufloksacyiny (TOS) z jej żelatynowaną powierzchnią z użyciem aldehydowego i aminowego łącznika. Ilości obydwu antybiotyków związanych z żelatynową warstwą oceniono na podstawie różnic w stężeniu leków,

EVALUATION OF THE BINDING OF FLUOROQUINOLONE ANTIBIOTICS TO THE VASCULAR PROSTHESIS

DOROTA KOWALCZUK^{*1}, GRAŻYNA GINALSKA², MAŁGORZATA MIAZGA-KARSKA²

¹CHAIR AND DEPARTMENT OF MEDICINAL CHEMISTRY,
MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN,
4 JACZEWSKIEGO STREET, 20-090 LUBLIN, POLAND

²CHAIR AND DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY,
MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN,
1 CHODZKI STREET, 20-093 LUBLIN, POLAND.

Abstract

Antimicrobial gelatine-sealed vascular prosthesis was developed by the covalent bonding of sparfloxacine (SPA) or tosufloxacine (TOS) to their surface by using of aldehyde and amine linkers. The amounts of both antibiotics bound to the gelatine layer were evaluated on the basis of the differences in drug concentrations before and after immobilization measured by HPLC

przed i po immobilizacji, określanych metodą HPLC. Aktywność przeciwbakteryjną protezy modyfikowanej antybiotykiem wobec szczepów oceniono stosując test hamowania stref wzrostu i test liczenia kolonii. Przeprowadzone z użyciem szczepów *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* badania wykazały, że kowalencyjna immobilizacja SPA i TOS na powierzchni implantu stanowi stabilną przeciwbakteryjną ochronę przez co najmniej 2 tygodnie.

[Inżynieria Biomateriałów, 99, (2010), 34-37]

Wprowadzenie

W przypadku stosowania syntetycznych materiałów implantacyjnych, należy zawsze liczyć się z ryzykiem pooperacyjnych infekcji powszczepiennych. Infekcja wszczepionej protezy naczyniowej sama w sobie jest rzadką, ale poważną komplikacją chirurgii naczyniowej. Przypadki zakażenia wszczepionych protez notowano zmiennie od 1% do 6% [1,2]. Z punktu widzenia prewencji, nadrzędną potrzebą jest otrzymanie protezy z substancją, która zapobiega powstawaniu biofilmu.

Celem prezentowanej pracy było otrzymanie przeciwbakteryjnej protezy naczyniowej z kowalencyjnie związanymi antybiotykami fluorochinolonowymi (sparfłoksacyną lub tosufłoksacyną), używając homobifunkcjonalnego aldehydu i multi-aminy jako łączników, w celu redukcji pooperacyjnych infekcji.

Metody

Fragmenty protez naczyniowych (10x5 mm) pokrytych żelatyną (Vascutek® Gelsoft) aktywowano glutaraldehydem według procedury zawartej w patencie [3]. Zaktywowaną powierzchnię poddano działaniu dietylenotriaminy (łącznik aminowy) i ponownie glutaraldehydu (łącznik aldehydowy), a następnie tak zmodyfikowaną powierzchnię połączono ze SPA (Rhône-Poulenc Rorer, France) lub TOS (Chemos GmbH, Niemcy) w środowisku dimetylosulfotlenku (DMSO). Celem zwiększenia trwałości wiązania, ugrupowania iminowe zredukowano wodorem „in statu nascendi” z użyciem borowodoru sodu do ugrupowań aminowych.

Celem optymalizacji procesu immobilizacji, zmodyfikowane próbki poddano oddziaływaniu roztworom SPA lub TOS o różnych stężeniach 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,2 mg/ml i 0,1 mg/ml przygotowanych w DMSO. Roztwory przygotowane do immobilizacji i otrzymane po tym procesie, po odpowiednim rozcieńczeniu, oznaczono metodą HPLC z detekcją UV (Waters HPLC system) dla oceny całkowitej ilości leku związanego z powierzchnią zmodyfikowanej próbki.

Aktywność przeciwbakteryjną protez naczyniowych ze związanym chemioterapeutycznym testowano in vitro wobec szczepów bakteryjnych *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Escherichia coli* ATCC 25992, odpowiedzialnych za infekcje pooperacyjne, z zastosowaniem badania hamowania stref wzrostu bakterii (Mueller-Hinton agar) i liczenia kolonii (Mueller-Hinton bulion). Obecność żywych bakterii kontrolowano przyrostem wartości CFU.

Rezultaty

Do otrzymania przeciwbakteryjnych protez naczyniowych zastosowano sparfłoksacynę i tosufłoksacynę. Fluorochinolonowe antybiotyki zostały wybrane ze względu na ich szerokie spektrum działania przeciwbakteryjnego wobec bakterii gram-dodatnich i gram-ujemnych.

Przeciwbakteryjne właściwości powierzchni protezy

method. Antimicrobial activity of antibiotic-modified prosthesis against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains was assessed using zone of inhibition and colony count assays. The performed researches indicated that the covalent immobilization of SPA and TOS on the graft surface resulted in stable antibacterial protection for at least of 2 weeks.

[Engineering of Biomaterials, 99, (2010), 34-37]

Introduction

The risk of postoperative graft infections must be taken into account when these synthetic materials are applied. Infection of the prosthetic vascular graft itself is a rare but serious complication of vascular surgery. The incidence of prosthetic graft infections has been reported to vary from 1% to 6% [1,2]. From a prevention standpoint, the need to develop a prosthesis with substance that prevents a biofilm formation is paramount.

The aim of the present paper was to obtain antibacterial vascular prosthesis with a covalent binding of a fluoroquinolone antibiotics (sparfloxacin or tosufloxacin), using of homobifunctional aldehyde and multi-amine as linkers, in order to reduce postoperative infections.

Methods

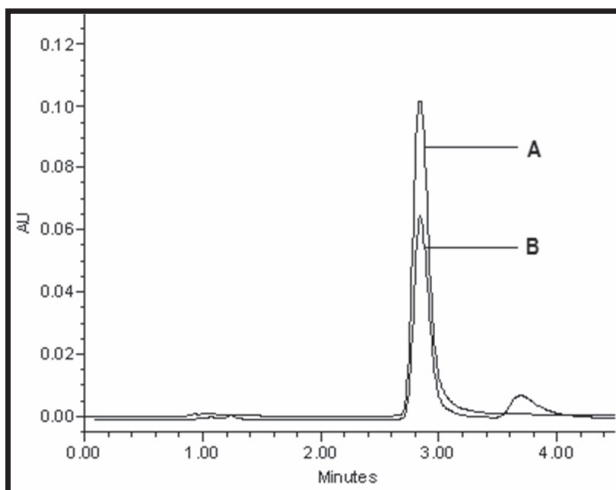
A vascular prosthesis segments (10x5 mm) gelatine-sealed (Vascutek® Gelsoft) were activated with glutaraldehyde according to the procedure described in the Polish Patent [3]. The activated surface was subjected to impact of diethylenetriamine (amine linker) and again of glutaraldehyde (aldehyde linker), and then such modified surface was linked to SPA (Rhône-Poulenc Rorer, France) or TOS (Chemos GmbH, Germany) in dimethyl sulfoxide (DMSO) medium. In order to an increase of the bond stability, the imine group was reduced with hydrogen „in statu nascendi” to amine group using sodium borohydride. With the aim of optimizing the immobilization process, the modified samples were subjected to impact solutions of SPA or TOS at the different concentrations of 2.0 mg/ml, 1.0 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.2 mg/ml and 0.1 mg/ml prepared in DMSO. The solutions prepared for the immobilization and the solutions obtained after this process, adequate diluted, were determined by HPLC method with UV-detection (Waters HPLC system) for the evaluation of the total amount of drug linked with surface of the modified sample.

Antimicrobial activity of the vascular prosthesis with the bound chemotherapeutic agent was tested in vitro against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25992 bacterial strains, responsible for postoperative infections, using zone of bacterial growth inhibition (Mueller-Hinton agar) and colony count (Mueller-Hinton broth) assays. The presence of living bacteria in broth medium was controlled as a CFU value increase.

Results

To obtain the antimicrobial vascular prosthesis, sparfloxacin and tosufloxacin was used. This fluoroquinolone antibiotics were selected because of their broad-spectrum antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative microorganisms.

Antimicrobial properties of prosthesis surface was obtained by an alternatively activation with glutaraldehyde and diethylenetriamine, and then by coupling with SPA or TOS in organic medium to form a relatively stable Schiff base following by hydrogen reduction.



RYS.1. Przykładowe chromatogramy otrzymane dla roztworów przed (A) i po (B) immobilizacji przy stężeniu początkowym TOS 1.0 mg/ml.

FIG.1. The exemplary chromatograms obtained for the solutions before (A) and after (B) immobilization at initial TOS concentration of 1.0 mg/ml.

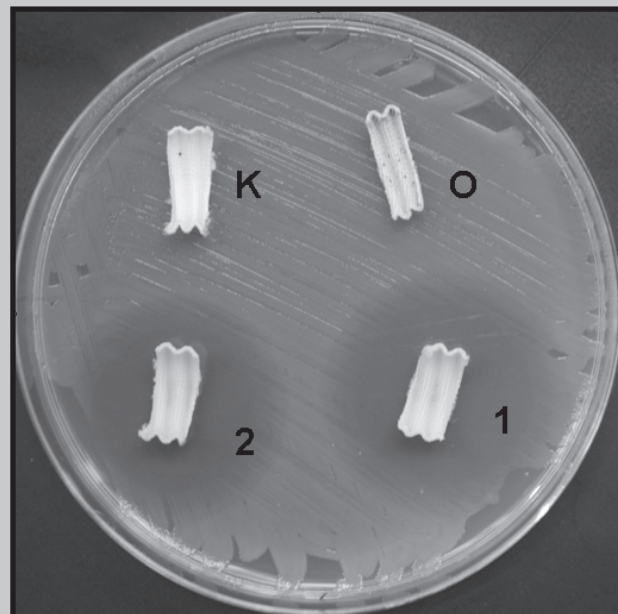
otrzymano przez naprzemienną aktywację glutaraldehydem i dietylenotriaminą, a następnie przez połączenie ze SPA lub TOS w organicznym środowisku tworząc stosunkowo trwałą zasadę Schiff'a, w kolejnym etapie zredukowaną wodorem.

Ilości leków związanych ze zmodyfikowaną powierzchnią protezy obliczono na podstawie różnic w stężeniach SPA lub TOS, przed i po immobilizacji, oznaczonych metodą HPLC (RYSUNEK 1). Ilości antybiotyków przyłączonych do biomateriału były różne w zależności od ich stężeń w roztworach użytych do immobilizacji. Ze wzrostem początkowego stężenia leków, ilości tych leków związane z nośnikiem rosły, ale wydajność immobilizacji malała. Stężenie antybiotyku w zakresie 2 - 1 mg/ml zostało wybrane jako optymalne do immobilizacji obydwu leków biorąc pod uwagę wydajność tego procesu (ok. 50%) i aktywność przeciwbakteryjną tak otrzymanego implantacyjnego materiału.

Zmodyfikowane próbki ze SPA lub TOS zbadano pod względem ich działania wobec szczepów *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Escherichia coli* ATCC 25992 stosując test płytkowy. Jak pokazano (RYSUNEK 2), strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół próbek ze SPA lub TOS otrzymanych po immobilizacji w roztworze o stężeniu 0.2 mg/ml wynosiły 10–15 mm, a dla próbek ze SPA lub TOS otrzymanych po immobilizacji w roztworze o stężeniu 2.0 mg/ml wynosiły 25–30 mm. Próbkę nie modyfikowaną antybiotykiem nie wykazały stref zahamowania wobec wszystkich badanych szczepów, podobnie jak próbki aktywowane tylko glutaraldehydowym i aminowym łącznikiem. Obecność stref zahamowania wzrostu bakterii wokół próbek zawierających antybiotyki demonstruje, że proces immobilizacji nie zmienił aktywności przeciwbakteryjnej SPA i TOS.

Aktywność przeciwbakteryjną zmodyfikowanych próbek ze SPA lub TOS otrzymanych przy stężeniu 1 mg/ml potwierdzono przy użyciu testu cieczowego wobec tych samych szczepów bakteryjnych, jak również w badaniu płytkowym. Brak wzrostu bakterii może sugerować, że antybiotyk był zdolny dyfundować do bulionu i był aktywny. Jak pokazano (TABELA 1), próbka zmodyfikowana SPA była chroniona przed kolonizacją mikroorganizmów przez 17 dni (*E.coli*) i 16 dni (*S. aureus*), podczas gdy próbka zmodyfikowana TOS była chroniona przed kolonizacją mikrobów przez 16 dni (*E. coli*) i 9 dni (*S. aureus*).

Na podstawie testów mikrobiologicznych można wyde-



RYS.2. Strefy zahamowania wzrostu jako przejaw aktywności przeciwbakteryjnej modyfikowanych protez. K - kontrola niemodyfikowana, O - kontrola modyfikowana łącznikami, 1- próbka ze SPA modyfikowana przy stężeniu 2 mg/ml, 2 - próbka ze SPA modyfikowana przy stężeniu 0.2 mg/ml.

FIG.2. Zones of bacterial growth inhibition as a function of antibacterial effect of the modified biomaterial; K - unmodified sample, O - sample modified with linkers, 1- sample with SPA modified at concentration of 2 mg/ml, 2 - sample with SPA modified at concentration of 0.2 mg/ml.

The amounts of drugs bound to the modified prosthesis surface were calculated on the basis of the differences in SPA or TOS concentrations, before and after immobilization, determined by HPLC method (FIGURE 1). The quantities of antibiotics attached to biomaterial were altered by changing their concentrations in solutions used for immobilization. With increasing initial concentration of drugs, the amounts of these drugs associated with the carrier were increased, but immobilization yield decreased. The antibiotic concentration in the range of 2 - 1 mg/ml was selected as optimal for immobilization of both drugs, taking into account the yield of this process (about 50%) and antimicrobial activity of such obtained implantable material.

The modified samples with SPA or TOS were examined for their effect against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25992 strains by using of plate test. As it has been shown (FIGURE 2), the zones of bacterial growth inhibition around the samples with SPA or TOS obtained after immobilization in a solution of 0.2 mg/ml were 10-15 mm, and for the samples with SPA or TOS obtained after immobilization in a solution of 2.0 mg/ml were 25-30 mm. The unmodified samples without antibiotic showed no zones of inhibition against all tested strains, similarly as samples modified only with glutaraldehyde and amine linkers. The presence of inhibition zones of bacterial growth around antibiotic-containing samples demonstrated that the immobilization process did not change the antimicrobial activity of SPA and TOS.

Antimicrobial activity of the modified samples with SPA or TOS, obtained at concentration of 1 mg/ml, was confirmed by use of the liquid test against the same bacterial strains as in plate test. The lack of bacterial growth can suggest that antibiotic was able to diffuse into the culture medium and was active. As it has been shown (TABLE 1), the SPA-

TABELA 1. Hamujący wpływ immobilizowanego antybiotyku na wzrost *E. coli* i *S. aureus*.
TABLE 1. Inhibiting effect of the immobilized antibiotic on growth of *E. coli* and *S. aureus*.

Badana próba Test sample	CFU, days																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Próba kontrolna A* Control sample A*	Wzrost zlewny Heavy growth	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Próba kontrolna B* Control sample B*	Heavy growth	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Escherichia coli																	
Próba ze SPA Sample with SPA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4x10 ⁸
Próba z TOS Sample with TOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Heavy gro- wth
Staphylococcus aureus																	
Próba ze SPA Sample with SPA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	3x10 ⁶
Próba z TOS Sample with TOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	He- avy gro- wth	-	-	-	-	-	-
*-control sample A - the unmodified sample, control sample B - the sample modified with linkers																	

dukować, że aktywność przeciwbakteryjna protez naczyniowych zmodyfikowanych SPA i TOS była spowodowana zarówno dyfuzją obydwu antybiotyków do agar i bulionu (niekowalencyjne wiązanie leków) jak i obecnością obydwu antybiotyków na powierzchni (kwalencyjne wiązanie leków).

Podziękowania

Badanie było finansowane z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, KBN No N N405 385037.

modified sample was protected from microbial colonization for 17 days (*E. coli*) and 16 days (*S. aureus*), whereas the TOS-modified sample was protected from microbial colonization for 16 days (*E. coli*) and 9 days (*S. aureus*).

From microbiological tests, it can be deduced that the antimicrobial activity of SPA and TOS modified vascular prostheses was due to the diffusion of both antibiotics into agar and broth media (non-covalent attached drugs) and to the presence of both antibiotics on the surface (covalent attached drugs).

Acknowledgements

This research was supported by a grant from Ministry of Scientific Research and Information Technology, KBN No N N405 385037.

Piśmiennictwo

- [1] Zeltsman D, Tzarnas CD, Kerstein MD. Management of vascular prosthetic infections: results of long-term follow-up. *Am Surg.* 65 (1999) 331–333.
 [2] Wilson SE. New alternatives in management of the infected vascular prosthesis. *Surg Infect.* 2 (2001) 171–177.

References

- [3] Ginalska G., Uryniak A., Łobarzewski J., Osińska M. Polski Patent Nr 201383 Sposób immobilizacji antybiotyków zawierających I-rzędowe grupy aminowe ze stałymi matrycami pokrytymi białkiem, (2003)

BIODEGRADOWALNE MATERIAŁY POLIMEROWE WYKORZYSTYWANE JAKO MATERIAŁY NA ELEMENTY STABILIZUJĄCE

KUCIEL S., LIBER-KNEĆ A., KUŹNIAR P.

POLITECHNIKA KRAKOWSKA IM. TADEUSZA KOŚCIUSZKI,
WYDZIAŁ MECHANICZNY,
AL. JANA PAWŁA II 37, 31-864 KRAKÓW

Streszczenie

W pracy oceniono możliwość wykorzystania nowych biodegradowalnych polimerów pochodzenia naturalnego, jako materiałów do wytwarzania elementów stabilizujących w ortopedii. Oceniono podstawowe właściwości wytrzymałościowe oraz wpływ procesu biodegradacji w roztworze soli fizjologicznej i pryzmie kompostowej na badane właściwości. Próbkę wkładano do wrzącej wody i zaginano, w celu oceny podatności polimeru do kształtowania, a także sprawdzano trwałość nadanego kształtu. Spośród badanych polimerów najlepszy do potencjalnego zastosowania na elementy stabilizujące, np. dla małych zwierząt okazał się Bio-Flex F6510.

Słowa kluczowe: polimer biodegradowalny, ortopedia, opatrunki stabilizujące
[Inżynieria Biomateriałów, 99, (2010), 38-41]

Wstęp

Obecnie wybór materiałów wykorzystywanych w ortopedii do stabilizacji i korekcji jest bardzo szeroki. Stosowany od stuleci opatrunek gipsowy w postaci bawełnianych taśm przesyconych gipsem, moczy się w wodzie, a następnie zakłada i modeluje na pacjencie. Pomimo, iż czas wiązania opatrunku gipsowego rozpoczyna się już po 10 minutach i kończy po około 45, to gips do pełnego wyschnięcia potrzebuje około 24 godzin. Często zamiast gipsu stosuje się opatrunki wykonane z materiałów polimerowych. Wykorzystuje się poliuretan, który na skutek kontaktu z wodą twardnieje, dodatkowo jest on wzmocniony włóknami szklanymi dla zwiększenia sztywności opatrunku. Takie opatrunki są dużo lżejsze od gipsu, szybciej schną niż opatrunek gipsowy, ale często koszt ich jest wysoki. Innym rozwiązaniem może być stosowanie opatrunków stabilizujących z polimerów termoplastycznych, które uzyskują pożądaną sztywność po kilku minutach od ich ukształtowania i ochłodzenia. Polimer taki mięknie w temperaturze około 60-80°C. Do jego ogrzania wykorzystuje się kąpiel we wrzącej wodzie, nagrzewanie gorącym powietrzem lub falą mikrofalową. Czas mięknięcia zależy zwykle od źródła ciepła, wymiaru elementu i może wynieść od 30 sekund do 2 minut. Do materiałów, które były badane pod względem wykorzystania na elementy stabilizatorów należą: polimetakrylan metylu, polichlorek winylu i jego kopolimery, polialkohol winylowy, octan celulozy, polietylen, polistyren, a także duroplasty tj. żywica formaldehydowa i żywice poliestrowe [1,2]. Obecnie wykorzystanie biodegradowalnych polimerów produkowanych z roślin pozwala na produkcję nietoksycznych, biodegradowalnych elementów wykorzystywanych do stabilizacji w ortopedii, ulegających degradacji w czasie sześciu miesięcy w warunkach kompostowania [3,4].

BIODEGRADABLE BIOPOLYMER MATERIALS FOR USING IN ORTHOPEDY AS A SPLINT MATERIAL

KUCIEL S., LIBER KNEĆ A., KUŹNIAR P.

TADEUSZ KOŚCIUSZKO CRACOW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING
37 JANA PAWŁA II AVENUE, 31-864 CRACOW

Abstract

In this work, possibility of using new biodegradable polymers from renewable resources as materials for stabilization elements in orthopedy was estimated. An influence of biodegradation process in physiological saline and in garden compost on basic mechanical properties was estimated. Specimens were put into boiling water and bended to estimate polymers ability for shaping and also stability of the shape. The best among tested polymers for using as stabilization elements, for instance for small animals, had Bio-Flex F6510.

Key words: biodegradable polymer, orthopedy, thermoplastic splint
[Engineering of Biomaterials, 99, (2010), 38-41]

Introduction

Nowadays selection of materials applied in orthopedy for stabilization and correction has a wide variety. For centuries gypsum plaster in the form of cotton tape impregnated with gypsum has been used. Gypsum plaster soaks in water and is shaped to be fit to the patient's body. Even though the setting of unmodified plaster starts about 10 minutes after mixing and is complete in about 45 minutes; the cast is not fully dry though for 24 hours. Plaster casts made of synthetic materials are often used instead of classical calcined gypsum. Polyurethane used as a plaster cast becomes stiff in contact with water and additionally is filled with glass fibres to increase stiffness of the plaster. These plasters are lighter and dry much faster than gypsum plaster cast but their cost is higher. Another solution may be using a thermoplastic polymer as a stabilisation cast which hardens within few minutes after shaping and cooling. Thermoplastic splint is softened by heating at a minimum temperature of 60-80°C. The possible activation sources are: boiled water bath, air-heat gun, heating plate, microwave oven. The activation time usually depends on the heat source and the product size, and varies from 30 seconds to 2 minutes. The materials which have been considered experimentally for the construction of splints includes: polymethyl methacrylate, polyvinyl chloride and copolymers, polyvinyl acetate, cellulose acetate, polythene, polystyrene and also thermosets: phenolformaldehyde and polyester resins [1,2]. Nowadays application of biodegradable polymers obtained from plants allows producing non-toxic biodegradable splints, undergoing degradation in time of six months in compost conditions [3,4].

The aim of the work was to estimate the possibility of using new biodegradable polymers from natural renewable sources as materials for thermoplastic splints.

Celem pracy była ocena możliwości wykorzystania nowych biodegradowalnych polimerów pochodzenia naturalnego, jako materiałów do wytwarzania elementów stabilizujących w ortopedii.

Materiały i metody badań

W badaniach wykorzystano nowe naturalne termoplastyczne polimery: BC-LBI01 i BC-LBI08 z serii BioCérchs produkowane na bazie pszenicy przez FuturMat oraz Bio-Flex® F 6510 i Biograde® C 9555 produkowane przez FKUR® Plastics. Bio-Flex® F 6510 jest mieszaniną poliestru i polilaktydu z dodatkiem dużej ilości naturalnego materiału, nie zawiera skrobi ani jej pochodnych. Biograde® C 9555 jest białą, nieprzeźroczystą mieszaniną celulozową.

Standardowe próbki wiośelkowe wytworzono metodą wtrysku w zakładach Azotowych w Tarnowie przy użyciu wtryskarki Engel ES 200/40 HSL. Parametry procesu wtrysku dla biopolimerów BC-LBI01 i BC-LBI08 były następujące: temperatura wtrysku 150°C, temperatura formy 50°C, ciśnienie wtrysku 70 MPa, czas cyklu 40 s (czas chłodzenia 20 s). Dla biopolimeru Biograde® C 9555 parametry procesu wynosiły: temperatura wtrysku 220°C, temperatura formy 60°C, ciśnienie wtrysku 90 MPa, czas cyklu 50 s (czas chłodzenia 20 s). Dla Bio-Flex® parametry procesu były takie same jak dla Biograde® C 9555 z wyjątkiem temperatury wtrysku, która wynosiła 180°C.

W celu oceny procesu biodegradacji i właściwości badanych materiałów, jeden zestaw próbek został umieszczony w roztworze soli fizjologicznej o temperaturze 40°C na 7 dni, a drugi w przymie kompostowej (od kwietnia do czerwca, na 60 dni). Statyczną próbę rozciągania przeprowadzono przy użyciu maszyny wytrzymałościowej Instron zgodnie z normą PN - EN ISO 527-1 dla próbek przed i po inkubacji. Oznaczono wytrzymałość na rozciąganie, moduł sprężystości i odkształcenie przy zerwaniu.

Dla oceny zdolności zachowania nadanego kształtu wykonano próby zaginania próbek wiośelkowych ogrzanych w wodzie o temperaturze 80-90°C przez 2 minuty na rurze o średnicy 40 mm do uzyskania równoległego położenia końców próbki. Próbkę po zagięciu utrzymywano w tym położeniu do ich wstępnego schłodzenia. Mierzono zmianę odległości pomiędzy końcami zagiętych próbek po 1 dniu (RYS.1). Dodatkowo wykonano też 10 minutowe próby relaksacji tak zginanych próbek na maszynie wytrzymałościowej Instron.

Wyniki i dyskusja

W TABELI 1 porównano oznaczone gęstości polimerów oraz temperaturę mięknienia Vicata i masowy wskaźnik szybkości płynięcia. W przypadku polimeru GC temperatura mięknienia Vicata wydaje się za wysoka, aby mogło zachodzić mięknienie w temperaturze wody wrzą-

TABELA 1. Porównanie gęstości, temperatury mięknienia Vicata (TMV) i wskaźnika szybkości płynięcia (MFI) badanych polimerów.

TABLE 1. Comparison of density, Vicat softening point (TMV) and melt flow index (MFI) for tested polymers.

	Oznaczenie Index	Gęstość Density [g/cm ³]	TMV [°C]	MFI (170,2.16) [g/10min]
BC-LBI01	L1	1.30	67.6	6.1
BC-LBI08	L8	1.32	66.4	34.1
Bio-Flex® F 6510	FF	1.30	65.6	3-5
Biograde® C 9555	GC	1.67	116	6-12*
*MFI(230,5.0)				

derivatives. Biograde® C 9555 is a white, opaque cellulose blend.

Standard dumbbell type specimens were produced by injection molding in Zakłady Azotowe in Tarnow using Engel ES 200/40 HSL. The parameters of the injection process for biopolymer BC-LBI01 and BC-LBI08 were the following: injection temperature 150°C, mold temperature 50°C, injection pressure 70 MPa, cycle time 40 s (cooling time 20 s). For biopolymer Biograde® C 9555 parameters of the process were: injection temperature 220°C, temperature of form 60°C, injection pressure 90 MPa, cycle time 50 s (cooling time 20 s). For Bio-Flex® parameters of the process were the same as for Biograde® C 9555 except the injection temperature which was 180°C.

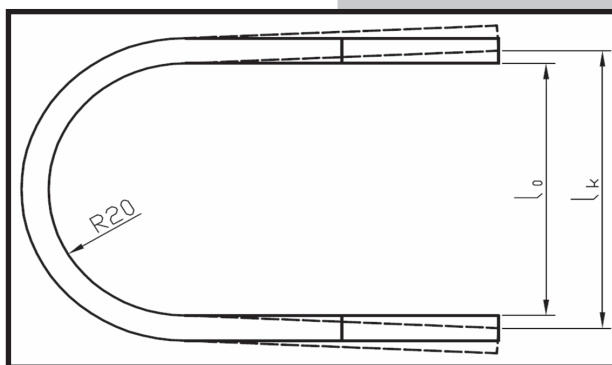
To estimate the influence of biodegradation process on the properties of tested materials, one set of the specimens was placed in physiological saline for 7 days at 40°C and another one in garden compost (since April till June, for 60 days). The tensile test for the specimens before and after incubation in these environments was carried out using Instron tensile machine according to PN - EN ISO 527-1. Tensile strength, modulus of elasticity and strain at break were calculated.

To estimate an ability to shape keeping, dumbbell type specimens were heated in water in temperature of 80-90°C for 2 minutes and bended on the tube (diameter of 40 mm) until ends of specimens got parallel position. Bended specimens were kept in this position until cooling down. The change of the distance between ends of bended specimens

after 1 day was calculated (FIG.1). Additionally relaxation test was done for these bended specimens using Instron machine.

Results and discussion

In TABLE 1 the density, the Vicat softening point and the melt flow index of tested materials were compared. In case of GC polymer, the Vicat softening point seems to be too high to enable polymer softening in boiled water and easy shaping of splint. Also its high density compared to other polymers may influence on high weight of the plaster.



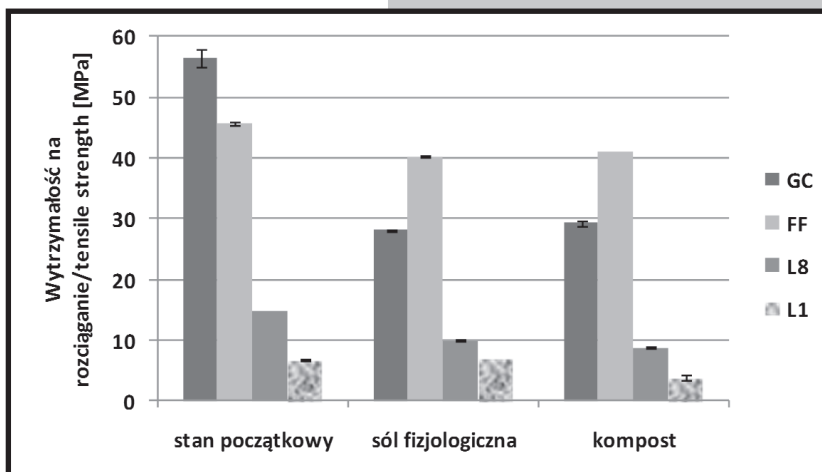
RYS.1. Schemat pomiaru zmiany odległości pomiędzy końcami zagiętych próbek
FIG.1. Scheme of distance measurement between ends of bended specimens

cej, umożliwiające łatwe kształtowanie opatrunku stabilizującego. Również jego wysoka gęstość w porównaniu z pozostałymi polimerami może powodować zbyt dużą masę całego opatrunku.

Na RYSUNKACH od 2 do 4 porównano zmiany właściwości wytrzymałościowych oznaczanych przy rozciąganiu dla badanych polimerów w trzech stanach: próbki po wtrysiku, próbki inkubowane w roztworze soli fizjologicznej oraz inkubowane w przymie kompostowej. Spośród badanych polimerów najszybszą biodegradację wykazują dwa polimery z serii BioCeres (L1 i L8) oraz Biograde (GC). Najwyższą wytrzymałością charakteryzują się dwa polimery GC i FF (RYS.2), a najniższą praktycznie dyskwalifikującą z punktu widzenia zastosowań na szyny polimer L1. Wysokim modulem sprężystości charakteryzuje się polimer GC, a zadawalającą lecz niższą o połowę jego wartością polimery FF i L8 (RYS.3). Najwyższą odkształcalnością przy zerwaniu – powyżej 50% wyróżniają się polimery FF i L1 (RYS.4). Przeprowadzone pomiary odległości pomiędzy końcami zgiętych próbek wykluczają zastosowanie polimerów L1 i GC na elementy stabilizujące ze względu na niewystarczającą stabilność nadanego kształtu (RYS.5). Dodatkowo przeprowadzone próby relaksacji tych dwóch polimerów (pozostałe – FF i L8 nie wykazywały efektów relaksacji naprężeń) potwierdziły występowanie, szczególnie dla polimeru GC, dużych utrzymujących się naprężeń po zagięciu próbki (RYS.6).

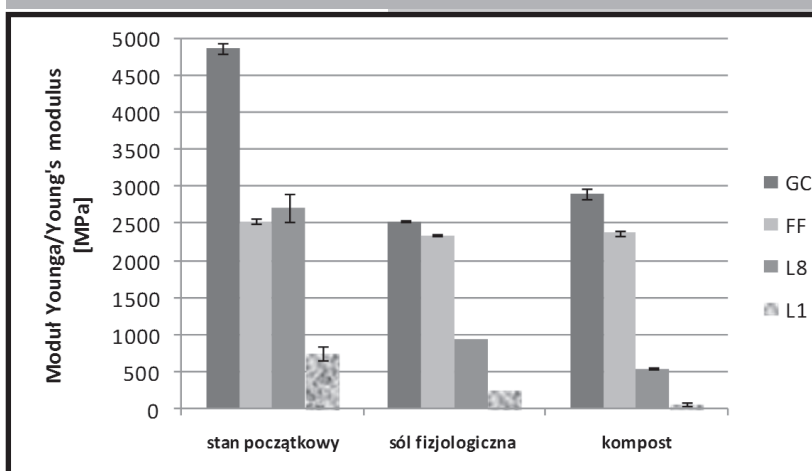
Wnioski

Przeprowadzone badania potwierdziły możliwość wykorzystania nowych biodegradowalnych polimerów produk-



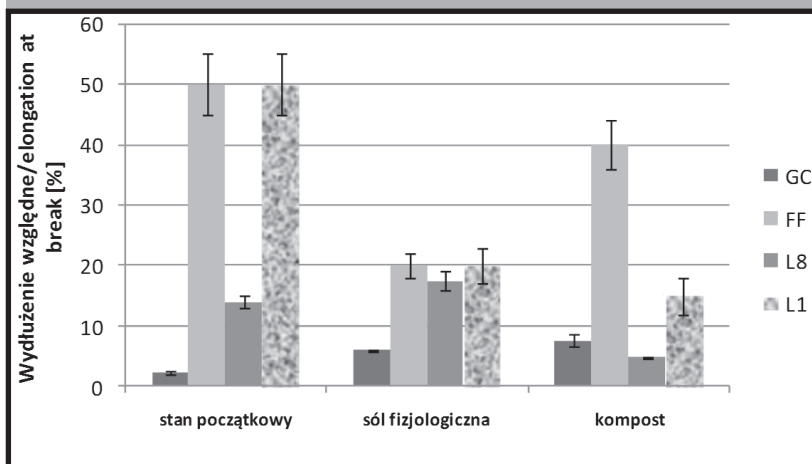
RYS.2. Porównanie wytrzymałości na rozciąganie badanych materiałów

FIG.2. Comparison of tensile strength for tested polymers



RYS.3. Porównanie modułu sprężystości badanych materiałów

FIG.3. Comparison of elasticity modulus for tested polymers



RYS.4. Porównanie odkształcenia przy zerwaniu badanych materiałów

FIG.4. Comparison of strain at break for tested polymers

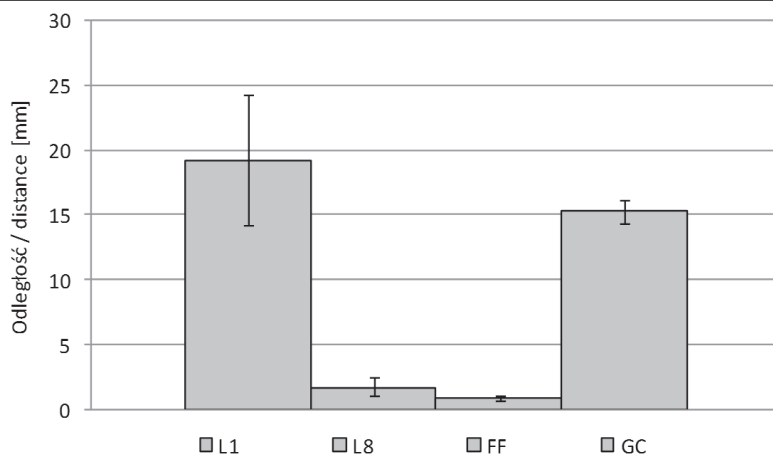
In FIGURE 2 to 4, changes of strength properties obtained in tensile test for tested polymers in three conditions: injected specimens, specimens incubated in physiological saline or in garden compost were compared. Among tested polymers, the fastest biodegradation process was observed for two polymers descending from the BioCérès range (L1 and L8) and Biograde (GC). Two polymers GC and FF have the highest tensile strength (FIG.2) and L1 has the lowest one which eliminates its application as a splint. The highest value of elasticity modulus was obtained for GC polymer; polymers FF and L8 have acceptable but half lower value of elasticity modulus (FIG.3). Strain at break measured for polymers FF and L1 obtained the highest value, exceeding 50% (FIG.4). The measurement of the distance between bended specimens' ends eliminates using as splint two polymers: L1 and GC because of insufficient stability of given shape (FIG.5). Additionally relaxation tests of these two polymers (FF and F8 didn't have relaxation effects) confirmed presence high stresses

in bended specimens, especially for GC polymer (FIG.6).

Conclusions

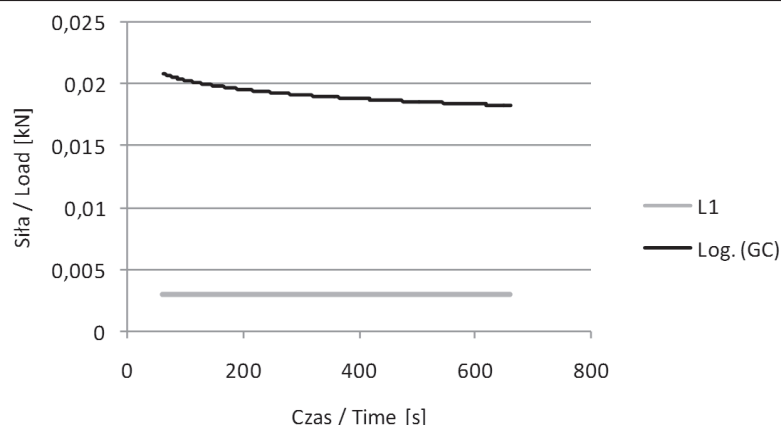
Conducted tests confirmed possibility of using new biodegradable polymers from natural renewable source-

wanych z odnawialnych surowców na elementy stabilizujące w ortopedii i weterynarii. Najlepszemu z polimerów, dla którego będzie można wytworzyć partię próbną opatrunków stabilizujących do przetestowania na zwierzętach jest polimer firmy FKur Bio-Flex F6510. Dodatkowo można go wzmocnić tkaniną lnianą, choć polimer ten charakteryzuje się również bez dodatków wysoką wytrzymałością na poziomie 45 MPa. Wykazuje on również najmniejszą degradację w roztworze soli fizjologicznej i duże odkształcenie przy zerwaniu, co powinno ułatwić plastyczne kształtowanie opatrunków. Opatrunki z takich polimerów cechują się dużą przyjaznością dla środowiska, tak ze względu na wytwarzanie ich z odnawialnych surowców, jak i przez fakt, iż ulegają biodegradacji.



RYS.5. Zmiana odległości i pomiędzy końcami zgiętych próbek po jednym dniu od ich ukształtowania

FIG.5. The change of distance between ends of bended specimens for 1 day after their shaping



RYS.6. Krzywe relaksacji dla biopolimeru BioCeres LBI01 (L1) i Biograde (GC)

FIG.6. Relaxation curves for biopolymer BioCeres LBI01 (L1) and Biograde (GC)

es as materials for stabilization elements in orthopedy and veterinary. The best among tested polymer is Bio-Flex F6510 produced by FKur which may be used for making test set of stabilization plasters or splints and tested on animals. Additionally, it may be reinforced by flax fabric, however this polymer has high tensile strength on the level of 45 MPa. It has also the lowest degradation in physiological saline and high elongation at break which ought to make easier plastic plasters shaping. Such polymer plasters are environmental friendly because of their renewable character and biodegradation at the end of life cycle.

Piśmiennictwo

- [1] Walasek P., Czy gips przejdzie do historii, Żyjmy dłużej 2000, 7.
[2] Katalog firmy Hartmann: Opatrunki unieruchamiające.

References

- [3] Kuciel S., Liber-Kneć A., J. of Biobased Materials and Bioenergy 2009, 3, 3, 262-274.
[4] Platt D.K., Biodegradable Polymers, Market Report, Smithers Rapra Limited, 2006.

MIKROSTRUKTURA I WŁAŚCIWOŚCI NISKOTARCIOWEJ NANOKOMPOZYTOWEJ POWŁOKI nc-TiC/a-C NA UTWARDZONYM TLENEM STOPIE Ti-6Al-7Nb

T.MOSKALEWICZ^{1*}, B.WENDLER², S.ZIMOWSKI¹, A.CZYRSKA-FI-
LEMONOWICZ¹

¹AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA
²POLITECHNIKA ŁÓDZKA,
UL. STEFANOWSKIEGO 1, 90-924 ŁÓDŹ, POLSKA
MAILTO: TMOSKALE@AGH.EDU.PL

Streszczenie

W pracy przedstawiono charakterystykę mikro/nanostruktury, właściwości mikro-mechanicznych i tribologicznych powłoki nc-TiC/a-C osadzonej na utwardzonym powierzchniowo atomami tlenu stopie Ti-6Al-7Nb. Badania mikro/nanostruktury przeprowadzono za pomocą skaningowej i transmisyjnej mikroskopii elektronowej na próbkach z przekroju poprzecznego. Stwierdzono, że powłoka nc-TiC/a-C zbudowana jest z nanokrystalicznych cząstek TiC w amorficznej osnowie węgla. W warstwie wierzchniej utwardzonego tlenem stopu występował roztwór stały tlenu w tytanie $\alpha(O)$. Zastosowana obróbka powierzchniowa istotnie poprawiła mikrotwardość oraz właściwości tribologiczne stopu Ti-6Al-7Nb (wzrost odporności na zużycie przez tarcie, zmniejszenie współczynnika tarcia).

[Inżynieria Biomateriałów, 99, (2010), 42-44]

Wprowadzenie

Stopy tytanu są szeroko stosowane w medycynie jako elementy endoprotez stawowych [1,2]. Do zastosowań tych predysponują je przede wszystkim korzystne właściwości mechaniczne i dobra odporność na korozję. Stopy tytanu mają jednak stosunkowo małą odporność na zużycie przez tarcie i duży współczynnik tarcia. W celu poprawy tych niekorzystnych właściwości tribologicznych stosuje się obróbkę powierzchniową [1]. Perspektywiczne znaczenie mogą mieć niskotarciowe powłoki nanokompozytowe, które charakteryzują się wyjątkowo korzystnymi właściwościami tribologicznymi i mechanicznymi. Wśród pokryw nanokompozytowych dużo uwagi poświęca się grupie powłok zbudowanych z nanokrystalicznych cząstek węglików (nc-MeC, Me=metal przejściowy tworzący węgliki) w amorficznej osnowie węgla (a-C) [3-5]. W celu umożliwienia przenoszenia przez powłokę znacznych obciążeń, stop Ti-6Al-7Nb (przed osadzeniem powłoki) utwardzono atomami tlenu w plazmie wylądowania jarzeniowego [6]. Celem obecnej pracy była charakterystyka mikro/nanostruktury oraz właściwości tribologicznych i mikro-mechanicznych powłoki nc-TiC/a-C osadzonej na utwardzonym powierzchniowo atomami tlenu stopie Ti-6Al-7Nb.

Materiał i metodyka badań

Badania przeprowadzono na dwufazowym ($\alpha+\beta$) stopie Ti-6Al-7Nb. Materiały zostały dostarczone przez firmę BÖHLER Edelstahl GmbH, Niemcy, w stanie po walcowaniu

MICROSTRUCTURE AND PROPERTIES OF LOW FRICTION NANOCOMPOSITE nc-TiC/a-C COATING ON Ti-6Al-7Nb ALLOY

T.MOSKALEWICZ^{1*}, B.WENDLER², S.ZIMOWSKI¹, A.CZYRSKA-FI-
LEMONOWICZ¹

¹AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
30 A.MICKIEWICZ AVENUE, 30-059 CRACOW, POLAND
²TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ,
1 STEFANOWSKIEGO STREET, 90-924 LODZ, POLAND
MAILTO: TMOSKALE@AGH.EDU.PL

Abstract

The microstructure as well as micro-mechanical and tribological properties of the nc-TiC/a-C coating deposited on oxygen hardened Ti-6Al-7Nb alloy were examined. Scanning- and transmission electron microscopy investigations on cross-section specimens were used for determination of microstructure and phase composition. It was found that the nc-TiC/a-C coating is composed of TiC nanocrystals embedded in an amorphous carbon matrix. The Ti $\alpha(O)$ solid solution enriched by interstitial oxygen atoms was mainly present in the near-surface region. A particular preliminary surface treatment of specimens significantly improved microhardness and final tribological properties: it increased wear resistance and decreased friction coefficient of the alloy against alumina bearing ball dry ball-on-disc sliding tests.

[Engineering of Biomaterials, 99, (2010), 42-44]

Introduction

Titanium alloys are widely used in medicine for components of joint prostheses because of advantageous mechanical properties and good resistance to corrosion [1,2]. The application of titanium and its alloys as biomaterials is limited by poor tribological properties (e.g. relatively low wear resistance and high friction coefficient). Therefore, in order to improve its tribological properties surface treatment is often applied [1]. Low friction nanocomposite coatings are among the fastest-growing areas of research with new materials being continually developed, which often exhibit exceptionally advantageous tribological and mechanical properties. As a nanocrystalline phase, transition metal carbide particles (nc-MeC, Me=carbide forming transition metal) are often used. An amorphous carbon, hydrogen-free (a-C) or hydrogenated (a-C:H) is used as a second phase [3-5]. In order to improve mechanical properties (especially hardness) of the Ti-6Al-7Nb alloy, a hard near-to-surface zone enriched in oxygen atoms was produced in this alloy [6]. The goal of this study was to characterize micro/nanostructure as well as micro-mechanical and tribological properties of the nc-TiC/a-C coating deposited on oxygen hardened Ti-6Al-7Nb alloy.

Materials and methods

The Ti-6Al-7Nb is a two phase ($\alpha+\beta$) titanium alloy. The alloy was delivered by BÖHLER Edelstahl GmbH, Germany, as hot rolled and annealed at 750°C/2 h alloy. The Ti-6Al-

na gorąco i wyżarzaniu (750°C/2h). Próbkę stopu Ti-6Al-7Nb poddano dyfuzyjnyemu utwardzeniu warstwy wierzchniej atomami tlenu w plazmie wyladowania jarzeniowego przy temperaturze 1173 K w atmosferze Ar+O₂. Następnie na tak utwardzonym podłożu osadzono powłokę nc-TiC/a-C metodą rozpylania magnetronowego. Szczegółowy opis obróbki powierzchniowej przedstawiono w pracy [7].

Badania mikro/nanostruktury przeprowadzono za pomocą skaningowej- oraz analitycznej i wysokorozdzielczej transmisyjnej mikroskopii elektronowej (SEM, TEM, HRTEM). Lamelle do badań TEM przygotowano za pomocą zbieżnej wiązki jonów (Focused Ion Beam; FIB). Identyfikację faz przeprowadzono metodą selektywnej dyfrakcji elektronów (SAED) oraz w oparciu o transformatę Fouriera obrazów HRTEM. Interpretację dyfraktogramów elektronowych i transformatę Fouriera przeprowadzono przy użyciu programu komputerowego JEMS [8].

Pomiary mikrotwardości i modułu Younga przeprowadzono na przekrojach poprzecznych próbek za pomocą urządzenia Micro-Combi-Tester firmy CSEM Instruments metodą Vickersa. Badania tarciovo-zużyciowe w ruchu obrotowym próbki wykonano na sucho w styku kula-płaszczyzna na triboteście typu „kula-tarcza” stosując kulę Al₂O₃ o średnicy 1 mm.

Wyniki i dyskusja badań

Mikrostruktura stopu Ti-6Al-7Nb zbudowana była z ziaren fazy α (struktura heksagonalna zwarta; HZ) i ziaren fazy β (struktura regularna przestrzennie centrowana; RPC). Wielkość ziaren oszacowano na obrazach mikrostruktury z TEM na ok. 0,1-1,5 μm dla fazy α i 0,1-0,3 μm dla fazy β. Stwierdzono, że w wyniku obróbki powierzchniowej mikrostruktura stopu uległa zmianie. Warstwa wierzchnia zbudowana była głównie z roztworu stałego tlenu w tytanie α(O). Pod warstwą wierzchnią obserwowano dwufazową mikrostrukturę, w której ziarna fazy α wzrosły do ok. 12 μm i ziarna fazy β do ok. 5 μm, w porównaniu z wielkością ziaren tych faz w stopie w stanie dostawy. Wyniki badań mikrostruktury stopu Ti-6Al-7Nb są przedstawione szczegółowo w pracy [9].

Grubość powłoki oszacowano na obrazach mikrostruktury obserwowanych za pomocą SEM i TEM na ok. 270 nm (RYS.1). Dyfraktogramy elektronowe wykonane z obszaru powłoki wykazywały amorficzny charakter. Pomiędzy powłoką a materiałem podłoża występowała międzywarstwa Ti α (HZ) o grubości ok. 35 nm. Międzywarstwa Ti została osadzona w celu poprawy przyczepności nanokompozytowych powłok nc-TiC/a-C do materiałów podłoża.

Szczegółowe badania nanostruktury powłoki wykonano za pomocą wysokorozdzielczej transmisyjnej mikroskopii elektronowej (HRTEM). W oparciu o transformatę Fouriera obrazów wysokorozdziel-

7Nb specimens were surface treated by thermal oxidation at 900 °C in the Ar+O₂ atmosphere in the presence of plasma glow discharge. The nc-TiC/a-C coating was deposited on oxygen hardened alloy by reactive magnetron sputtering. Details concerning the surface treatment is described in Ref. [7].

Micro/nanostructure of the as received and surface treated samples was characterised by scanning- as well as analytical- and high-resolution transmission electron microscopy (SEM, TEM, HRTEM). The cross-section lamellas were prepared by Focused Ion Beam (FIB). Phase identification was performed by means of selected area electron diffraction (SAED). The diffraction patterns were interpreted with the help of JEMS software [8].

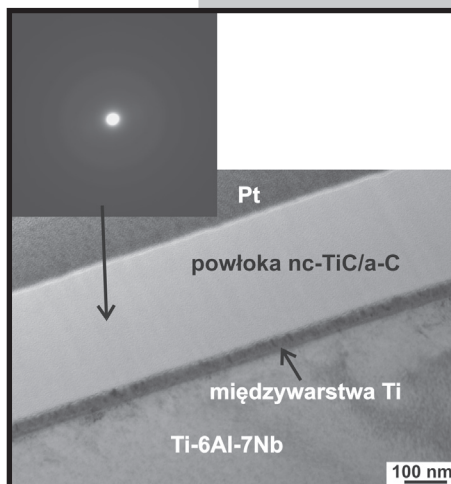
The nanohardness and Young's modulus were measured on cross-section samples using Nano- Combi-Tester of CSEM Instruments with a Berkovich indenter. Friction wear resistance was tested by means of the „ball-on-disc” method using a ball of Al₂O₃.

Results and discussion

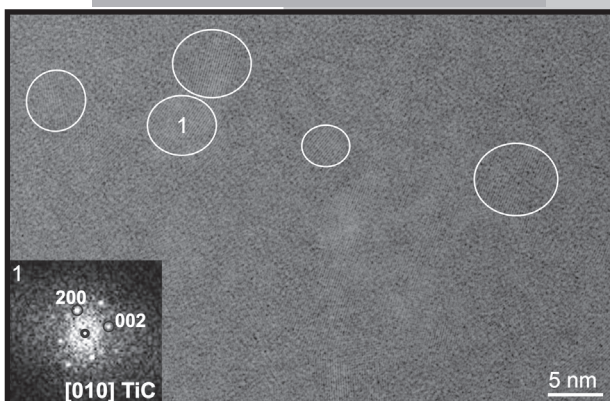
Microstructure of the as received Ti-6Al-7Nb alloy was consisted of α grains (hexagonal close-packed; hcp) and β grains (body-centred cubic; bcc). The size of α and β grains was measured from SEM and TEM images to be in the range of 0.1-1.5 μm and 0.1-0.3 μm, respectively. The microstructure of the Ti-6Al-7Nb substrate after surface treatment was changed. A diffusion zone consisting mainly of α (O) solid solution enriched by oxygen was present in the near surface region. The underlying bulk material (substrate) was consisted of α and β grains. The size of α and β grains was measured as up to 12 μm and up to 5 μm, respectively. Results of the Ti-6Al-7Nb alloy microstructure characterisation are described in Ref. [9].

SEM and TEM investigations of sample cross-section revealed that the coating was dense and had an uniform thickness of about 270 nm (FIG.1). Electron diffraction patterns (SAED) taken from the coating were composed of diffuse „hallo” diffraction rings what indicates for amorphous structure of the coating (e.g. SAED pattern in FIG.1). A very thin (35 nm thick) interlayer of Ti α (hcp) was present between the coating and the substrate. This interlayer was produced in order to increase adhesion of the nanocomposite nc-TiC/a-C coating to the underlying bulk material.

The detailed investigations of the coating by HRTEM revealed a presence of nanocrystals with size in the range of



RYS.1. Mikrostruktura powłoki nc-TiC/a-C na utwardzonym tlenem stopie Ti-6Al-7Nb oraz dyfraktogram elektronowy z powłoki, TEM cienka folia z przekroju poprzecznego
FIG.1. Microstructure of the nc-TiC/a-C coating on oxygen hardened Ti-6Al-7Nb alloy as well as SAED pattern taken from the coating and its identification. TEM cross-section thin foil



RYS.2. Nanostruktura powłoki nc-TiC/a-C na utwardzonym tlenem stopie Ti-6Al-7Nb oraz transformata Fouriera wykonana z obszaru oznaczonego na rys. jako 1 i jej identyfikacja, HRTEM
FIG.2. HRTEM micrograph of the nc-TiC/a-C coating on oxygen hardened Ti-6Al-7Nb alloy and corresponding FFT pattern calculated from the area marked as 1 on the figure and their identification

czych potwierdzono występowanie fazy TiC (RSC). Wielkość cząstek TiC w nanokompozytowej powłoce na stopie Ti-6Al-4V oszacowano na ok. 3÷7 nm (RYS.2).

Stwierdzono istotny wpływ zastosowanej obróbki powierzchniowej na poprawę twardości i właściwości tribologicznych stopu Ti-6Al-7Nb. Mikro-twardość powierzchni stopu po obróbce utwardzającej tlenem wzrosła z 3,4 GPa do ok. 10,6 GPa. Wyniki testu tribologicznego wykazały, że współczynnik tarcia stopu z powłoką nc-TiC/a-C wynosi ok. 0,15, zaś materiału podłoża 0,4-0,5 (RYS.3). Głębokość wytarcia stopu w stanie dostawy wynosiła 11 µm, stopu po utwardzaniu tlenem 0,19 µm, zaś stopu utwardzonego tlenem z powłoką nc-TiC/a-C tylko 0,06 µm.

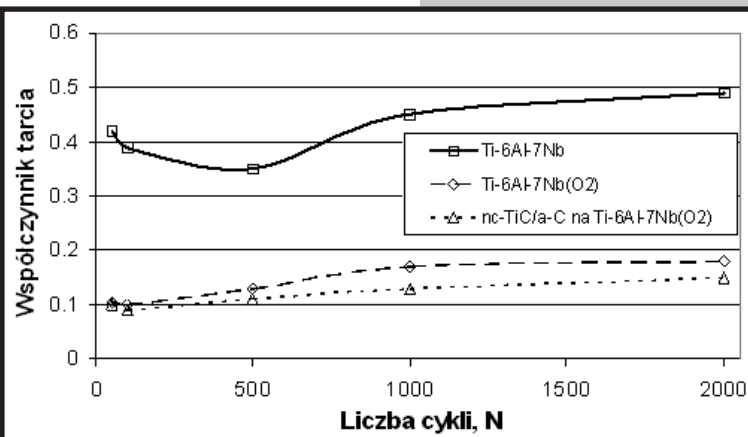
Podsumowanie

Nanokompozytowa powłoka nc-TiC/a-C osadzono na utwardzonym tlenem stopie tytanu Ti-6Al-7Nb poprzez rozpylanie magnetronowe. Grubość powłoki wynosiła ok. 270 nm. Powłoka nc-TiC/a-C była zbudowana z nanokrystalitów TiC (RSC) o wielkości 3÷7 nm osadzonych w amorficznej osnowie węgla. Pomiędzy materiałem podłoża, a powłoką nc-TiC/a-C stwierdzono występowanie międzywarstwy Ti α (HZ) o grubości ok. 35 nm.

Wykazano, że zastosowana obróbka powierzchniowa istotnie wpływa na obniżenie współczynnika tarcia oraz poprawę odporności na zużycie przez tarcie stopu Ti-6Al-7Nb.

Podziękowania

Badania zostały dofinansowane przez AGH-UST (projekt nr 11.11.110.791)



RYS.3. Współczynnik tarcia przy współpracy z kulką Al₂O₃ stopu Ti-6Al-7Nb, stopu Ti-6Al-7Nb po utwardzaniu tlenem oraz utwardzonego tlenem stopu Ti-6Al-7Nb z powłoką nc-TiC/a-C
FIG.3. Friction coefficient of baseline Ti-6Al-7Nb alloy, oxygen hardened Ti-6Al-4V alloy and nc-TiC/a-C coating on oxygen hardened alloy during dry sliding against alumina ball

3÷7 nm in amorphous matrix (Fig. 2). The calculated diffraction patterns obtained by performing FFT confirmed the presence of TiC (face-centred cubic; fcc) nanocrystals.

It was established that the applied surface treatment has an important beneficial influence on microhardness and tribological properties of the Ti-6Al-7Nb alloy. The microhardness of the examined alloy increases from 3.4 GPa for the as received alloy up to 10.6 GPa after surface treatment. It was measured by means of a "ball-on-disc" test that the friction coefficient of the nc-TiC/a-C coating on oxygen hardened Ti-6Al-7Nb alloy against an alumina ball is about 0.15, while for a substrate material it is 0.4-0.5

(FIG.3). The depth of the wear track after the test was 11 µm for as-delivered Ti-6Al-7Nb alloy, 0.19 µm for oxygen hardened alloy and only 0.06 µm for nc-TiC/a-C coating on oxygen hardened alloy.

Summary

Nanocomposite nc-TiC/a-C coating was successfully deposited on oxygen hardened Ti-6Al-4V alloy by reactive magnetron sputtering. The nc-TiC/a-C coating was about 270 nm thick and composed of 3÷7 nm diam. TiC (fcc) nanocrystals in an amorphous carbon matrix. A very thin (35 nm thick) interlayer of Ti α (hcp) was present between the coating and the substrate.

It was found that the applied duplex surface treatment significantly improved microhardness and tribological properties: it increased wear resistance and decreased friction coefficient of the alloy against an alumina bearing ball during dry sliding at ambient temperature.

Acknowledgement

The study was partially supported by the AGH-UST (project nr 11.11.110.791).

Piśmiennictwo

- [1]. X. Liua, P.K. Chub, Ch. Dinga, Mater. Sci. Eng. R 47 (2004) 49-121
- [2]. D.M. Brunette, P. Tengvall, M. Textor, P. Thomsen, Titanium in medicine. Berlin: Springer-Verlag; 2001
- [3]. Y.T. Pei, D. Galvan, J.T.De Hosson, A. Cavaleiro, Surf. Coat. Tech. 198 (2005) 44-50
- [4]. D. Martínez-Martínez, C. López-Cartes, A. Fernández, J.C. Sánchez-López, Thin Solid Films 517 (2009) 1662-1671
- [5]. K. Włodarczyk, M. Makówka, P. Nolzrak, B. Wendler, J. Achiev. Mater. Manuf. Eng. 37 (2009) 11-19

References

- [6]. B. Januszewicz, D. Siniarski, Vacuum 81 (2006) 215-220
- [7]. B. Wendler, W. Pawlak, J. Achiev. Mater. Manuf. Eng. 26 (2008) 207-210
- [8]. P. Stadelmann, JEMS: Java Electron Microscopy Software, <http://cimewwww.epfl.ch>
- [9]. T. Moskalewicz, B. Wendler, S. Zimowski, S. Milc, A. Czyrska-Filemonowicz, Inżynieria Biomateriałów 12 (2009) 89-91

OPTIMALIZACJA PROJEKTOWANIA SCAFFOLDU TYTANOWEGO PRZY UŻYCIU WNIOSKOWANIA ROZMYTEGO

SYLWIA SOBIESZCZYK

POLITECHNIKA GDAŃSKA, WYDZIAŁ MECHANICZNY,
UL. NARUTOWICZA 11/12, 80-233 GDAŃSK,
MAILTO: SSOBIESZ@PG.GDA.PL

Abstrakt

Opracowano metodę wnioskowania rozmytego do oszacowania geometrii scaffoldu Ti6Al4V, otrzymanego przy użyciu metody metalurgii proszków. Zaproponowana metoda umożliwia oszacowanie i optymalizację architektury scaffoldu poprzez dobór odpowiednich parametrów procesu. Zaprojektowano i przeprowadzono symulację działania sterownika rozmytego (FLC) za pomocą oprogramowania Matlab.

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 45-47]

Wprowadzenie

Tytan i jego stopy są materiałami implantacyjnymi często stosowanymi w ortopedii w celu zastąpienia zniszczonej kości oraz do zapewnienia rusztowania dla nowotworzonej tkanki kostnej. Rusztowania przenoszące obciążenia powinny mieć zbliżone własności do tkanki kostnej i jednocześnie wykazywać odpowiednią wytrzymałość mechaniczną. Biomateriały tytanowe posiadają pożądane własności, takie jak relatywnie niski moduł sprężystości, dobrą wytrzymałość na zmęczenie, plastyczność i odporność na korozję [1]. Porowate implanty tytanowe stanowią trójwymiarową strukturę z połączoną siecią porów, która umożliwia transport płynów fizjologicznych, waskularyzację oraz wzrost tkanki kostnej [2]. Dostępnych jest wiele metod produkcji tytanowych rusztowań, takich jak spiekanie proszków metalowych bez porogenów [3] i z użyciem porogenów [2], replika gąbki polimerowej [4], technologia szybkiego prototypowania, jak np. trójwymiarowe odkładanie włókien (3DFD) [5] i wiele innych. Jedną z metod użytych do utworzenia porowatego tytanowego rusztowania jest metoda metalurgii proszków przy użyciu gazu TiH_2 jako czynnika tworzącego pory [5]. Przy użyciu tej metody możliwe jest otrzymanie porowatej struktury tytanowej z kontrolowaną porowatością i jednorodnym rozkładem porów, uzyskując własności zbliżone do ludzkiej kości gąbczastej. Parametry procesu, takie jak temperatura spiekania i zastosowane ciśnienie podczas prasowania, mają wpływ na rozmiary porów oraz porowatość struktury.

Metodyka badań

Rozmyty system wnioskowania jest skuteczną metodą służącą do ustalenia związków pomiędzy wielkościami wejściowymi i wyjściowymi bez użycia modeli matematycznych [6]. Rozmyte zbiory wejściowe i wyjściowe zostały ustalone na podstawie badań przeprowadzonych przez Gu i in. [5]. Jako zmienne wejściowe przyjęto temperaturę spiekania ($840 \div 1100^\circ C$) oraz ciśnienie prasowania ($9 \div 88$ MPa). Rozmyte zbiory wyjściowe, to: rozmiar porów ($10 \div 200 \mu m$) oraz porowatość ($10 \div 70\%$). Przestrzeń wejściowa i wyjściowa zostały podzielone na zbiory rozmyte, którym nadano nazwy lingwistyczne: „bardzo mały (VS), mały

OPTIMALIZATION OF TITANIUM SCAFFOLD DESIGN USING FUZZY REASONING APPROACH

SYLWIA SOBIESZCZYK

GDANSK UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING,
11/12 NARUTOWICZA STREET, 80-233 GDANSK, POLAND
MAILTO: SSOBIESZ@PG.GDA.PL

Abstract

The geometry of Ti6Al4V scaffold, fabricated by powder metallurgy process, has been determined by using fuzzy reasoning approach. A proposed method showed the possibility of estimation and optimization the scaffold's architecture by choosing an appropriate processing conditions. A fuzzy logic controller (FLC) was utilized using Matlab Software.

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 45-47]

Introduction

Titanium and titanium alloys are frequently used as implanting materials in orthopaedic applications in order to replace damaged bone and to provide support for healing bone tissue. Load-bearing scaffolds should mimic the properties of the native bone and possess adequate mechanical strength. Titanium biomaterials possess desirable properties, such as relatively low elastic modulus, good fatigue strength, formability and corrosion resistance [1]. Porous titanium implants provide three-dimensionally interconnected pores which permit the transportation of body fluids, vascularization and in-growth of bone tissue [2]. There are several processing techniques to fabricate titanium scaffolds, such as sintering of metal powders [3], space-holder method [2], replication of polymeric sponge [4], rapid prototyping technology, like three-dimensional fiber deposition (3DFD) [5], and many others. Among them, the powder metallurgy process with the addition of TiH_2 as pore forming agent has been used [5]. Using this method it is possible to obtain a porous Ti6Al4V structure with controlled porosity and uniform pore size with properties similar to human cancellous bone. The pore size and porosity is affected by processing parameters, such as sintering temperature and pressure applied during powder compaction.

Material and methods

Fuzzy reasoning approach provides an efficient method to establish the relationships between an input and an output without the need of complex mathematical models [6]. Fuzzy input and fuzzy output sets have been established based on the research conducted by Gu et al. [5]. As input variables sintering temperature ($840 \div 1100^\circ C$) and compaction pressure ($9 \div 88$ MPa) have been chosen. Fuzzy output sets are: pore size ($10 \div 200 \mu m$), and porosity ($10 \div 70\%$). Input and output space have been divided into fuzzy triangular and trapezoidal sets, with linguistic names given: "very small (VS), small (S), medium (M), large (L), very large (VL)". The rule base has consisted of just 9 rules linking input values with output for certain parameters, which were introduced into Matlab environment, Fuzzy Toolbox [6]. Rules in the form "if – then" can be presented as decision table (Tab.1). The center of gravity defuzzification method has been used

(S), średni (M), duży (L) i bardzo duży (VL)". Rozmyta baza reguł składa się z 9 reguł rozmytych łączących odpowiednie parametry wejściowe oraz wyjściowe, wprowadzone do środowiska oprogramowania Matlaba, Fuzzy Toolbox [6]. Reguły w postaci zdań warunkowych „jeżeli-to” zostały przedstawione w tabeli decyzyjnej (TAB.1). Dla określenia wynikowych wartości wyjściowych wykorzystano metodę wyostrażania środka ciężkości (RYS.1).

Wyniki badań i dyskusja

Na podstawie wnioskowania rozmytego dla danych wartości wielkości wejściowych, otrzymano rozmyte zbiory wyjściowe (RYS.1). W wyniku procesu wyostrażania została wybrana tylko jedna wartość w odpowiedzi na dane wartości wejściowe. Jako przykład, dla wartości wejściowych temperatury spiekania 970oC oraz ciśnienia prasowania 45

Wejście rozmyte Fuzzy input				Wyjście rozmyte Fuzzy output			
If	T is VS	and	C is VS	then	PS is L	and	P is M
	T is S		C is M		PS is L		P is VL
	T is S		C is VL		PS is VS		P is S
	T is M		C is VS		PS is S		P is L
	T is M		C is S		PS is S		P is M
	T is M		C is M		PS is S		P is M
	T is M		C is L		PS is M		P is M
	T is M		C is VL		PS is VS		P is S
	T is L		C is M		PS is VS		P is S

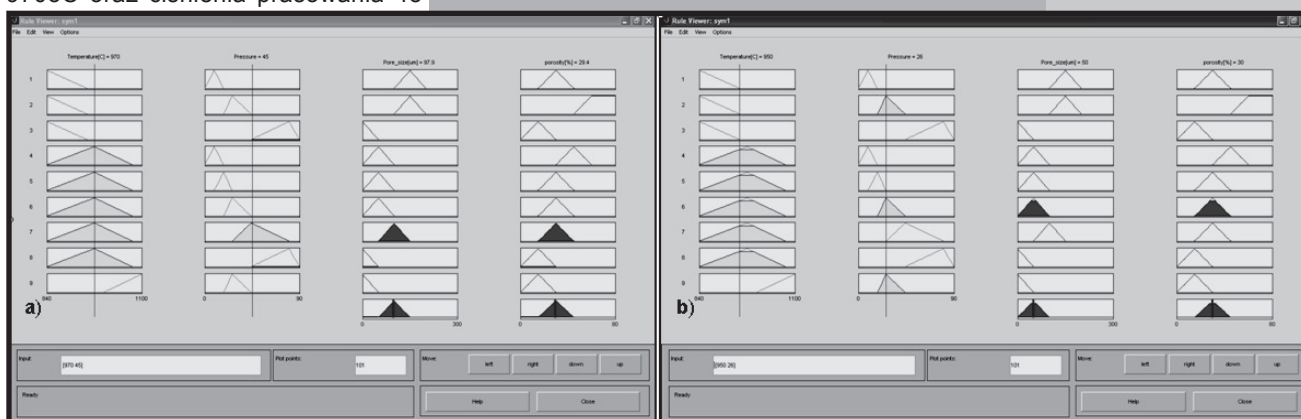
TABELA 1. Tabela decyzyjna bazy reguł rozmytych dla utworzenia porowatego rusztowania Ti6Al4V za pomocą metody metalurgii proszków [5], gdzie: T – temperatura spiekania [oC], C – ciśnienie prasowania [Pa], PS – średnica porów [μm], P – porowatość [%].

TABLE 1. Decision table of fuzzy rule base for fabrication of porous Ti6Al4V by powder metallurgy process [5], where: T – sintering temperature [oC], C – compression pressure [Pa], PS – pore size [μm], P – porosity [%].

to estimate the exact output values from fuzzy reasoning system as is show on FIG.1.

Results and discussion

Accordingly to approximate reasoning for chosen input variables values, the resultant output sets have been received (FIG.1). As a result of defuzzification process, only one value was chosen, in response to given input values. As an example, for the chosen input variables: applied sintering temperature of 970oC and compaction pressure of



RYS.1. Wyniki obliczeń metodą wnioskowania rozmytego dla procesu wytwarzania porowatej struktury Ti6Al4V: a) wielkości wejściowe – zastosowana temperatura spiekania 970oC oraz ciśnienie prasowania 45 MPa, wielkości wyjściowe – średnica porów 97,9 μm oraz porowatość 29,4%, b) wielkości wejściowe – zastosowana temperatura spiekania 950oC oraz ciśnienie prasowania 26 MPa, wielkości wyjściowe – średnica porów 50 μm oraz porowatość 30%.

FIG.1. Results of fuzzy reasoning system for fabrication of porous Ti6Al4V: a) the inputs - applied sintering temperature 970oC and compaction pressure 45 MPa, the outputs – pore size 97.9 μm and porosity 29.4 %, b) the inputs - applied sintering temperature 950oC and compaction pressure 26 MPa, the outputs – pore size 50 μm and porosity 30%

MPa, w wyniku przeprowadzonej symulacji uzyskano wielkości wyjściowe: średnicę porów 97,9 μm oraz porowatość 29,4%. Podobnie dla wielkości wejściowych, temperatury spiekania 950oC oraz ciśnienia prasowania 26 MPa, wartościami wyjściowymi są: średnica porów 50 μm oraz porowatość 30%. Otrzymane wartości średnicy porów oraz porowatości są zgodne z danymi eksperymentalnymi uzyskanymi w [5].

Wnioski

Za pomocą prostej metody wnioskowania rozmytego można określić optymalną geometrię architektury rusztowania dla wzrostu kości. Możliwe jest uzyskanie bardziej dokładnego modelu poprzez dodanie reguł rozmytych, mimo iż udowodniono, że liczba 9 reguł rozmytych jest wystarczającą do poprawnego określenia geometrii rusztowania. Zapropozowana metoda jest użytecznym narzędziem w przypadku, kiedy nie istnieje wystarczająca liczba danych eksperymentalnych.

45 MPa, the simulation results determined the outputs variables: pore size of 97.9 μm and porosity of 29.4%. Similarly, for the inputs variables: applied sintering temperature of 950oC and compaction pressure of 26 MPa, the outputs variables: pore size of 50 μm and porosity of 30%. The obtained pore size dimensions and porosity are in line with the experimental data achieved by Gu Y.W. et al.[5].

Conclusions

The optimal geometry of scaffold's architecture can be well determined using simple fuzzy reasoning method. It is possible to make the model more accurate by addition of fuzzy rules in order to make a better estimation of scaffold's architecture, although it has been proven that just 9 fuzzy rules is enough to properly predict the scaffold's geometry. Proposed method provides a useful tool within the range of area responses established, based on selective and limited representative experimental data.

Podziękowania

Badania zostały przeprowadzone w ramach projektu PORTAL (kontrakt nr NCBI/ERA-NET MATERA/5/2009).

Acknowledgments

The research has been performed as a part of the PORTAL Project (contract No. NCBI/ERA-NET MATERA/5/2009).

Piśmiennictwo

- [1] Gu Y.W., Yong M.S., Tay B.Y., Lim C.S.: Synthesis and bioactivity of porous Ti alloy prepared by foaming with TiH_2 . *Materials Science and Engineering*, vol. C 29 (2009) 1515-1520.
- [2] Karageorgiou V., Kaplan D.: Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26 (2005) 5474-5491.
- [3] Oh I.H., Nomura N., Masahashi N., Hanada S.: Mechanical properties of porous titanium compacts prepared by powder sintering. *Scripta Mater.* 49 (2003) 1197-1202.

References

- [4] Li J.P., Li S.H., de Groot K., Layrolle P.: Preparation and characterization of porous titanium. *Key Eng. Mater.* 218 (2002) 51-54.
- [5] Alvarez K., Nakajima H.: Metallic scaffolds for bone regeneration. *Materials*, 2 (2009) 790-832.
- [6] Łachwa A.: Rozmyty świat zbiorów, liczb, faktów, reguł i decyzji. *Problemy współczesnej nauki, teoria i zastosowania*. Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, Warszawa 2001.

WPŁYW DOMIESZEK NA PROCESY STERYLIZACJI BIOSZKŁA MAŁYMI DAWKAMI PROMIENIOWANIA JONIZUJĄCEGO

S.SZARSKA, I.MALISZEWSKA, K.TUPICA

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, 50-370 WROCŁAW
MAILTO: STANISLAWA.SZARSKA@PWR.WROC.PL

Streszczenie

W pracy pokazano wpływ domieszek na właściwości strukturalne bioszkieł. Przedstawiono sposoby otrzymywania i domieszkowania jonami srebra, miedzi lub żelaza, cienkich warstw bioszkieł otrzymanego metodą zol-żel. Określono aktywność bakteryjną Gram-ujemnych pałeczek ropy błękitnej *Pseudomonas aeruginosa* and Gram-dodatniego gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus* w domieszkowanych próbkach. Zbadano wpływ promieniowania ultrafioletowego na przeżywalność bakterii.

q: bioszkieło, efekt antybakteryjny, procesy sterylizacji, nanocząsteczki srebra

[*Inżynieria Biomateriałów*, 99-101, (2010), 47-50]

Wstęp

Biomateriały po wprowadzeniu do organizmu mogą ulec infekcji. Właściwości fizyczne materiału mogą wzmacniać jego odporność na mikroorganizmy. Biomateriał niemoodyfikowany, nie posiadający metalicznych domieszek, nie wykazuje właściwości bakteriobójczych. Wiadomo jednak,

INFLUENCE OF DOPANTS ON STERILIZATION PROCESS OF BIOGLASS OF SMALL DOSE RADIATION

S.SZARSKA, I.MALISZEWSKA, K.TUPICA

WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, WROCLAW, POLAND
MAILTO: STANISLAWA.SZARSKA@PWR.WROC.PL

Abstract

A recent study has shown that the occurrence of structural alteration of the bioglass which accompanies the remarkable change in glass properties depends on the ions to be incorporated. In this paper, the preparation and antibacterial activity of doped with silver, copper and iron (respectively) bioactive glass thin films, obtained by sol-gel processing, are reported. The antibacterial activity against Gram-negative *Pseudomonas aeruginosa* and Gram-positive *Staphylococcus aureus* has been examined. The influence of UV irradiation of different doses on these samples has been investigated.

Keywords: bioglass, antibacterial effect, sterilization process, silver nanoparticles

[*Engineering of Biomaterials*, 99-101, (2010), 47-50]

Introduction

Biomaterials, after their implantation into the organism, can enhance infections. At implantation, the surface of biomaterials provides easy access into both tissue cells and bacteria. The physical properties of the material gives protection against microorganisms. Bacteria can participate

że niektóre metale np. srebro znalazły zastosowanie jako środek wspomagający zwalczanie drobnoustrojów. [1,2] Oprócz wpływu srebra na przebieg procesów sterylizacji zbadany zostanie wpływ innych pierwiastków, takich jak żelaza czy miedzi [3] oraz adhezja bakterii do bioszkieł otrzymanych w zależności od ich składu. Do sterylizacji użyte będzie promieniowanie ultrafioletowe.

Po sterylizacji określona zostanie przeżywalność bakterii w zależności od składu materiału, na którym się znajdowały, oraz od czasu naświetlania.

Materiały

Na podstawie wcześniejszych badań [5,6] otrzymano bioszkieło o składzie $36\text{CaO} \cdot 60\text{SiO}_2 \cdot 4\text{P}_2\text{O}_5$ (mol%) (G- próbki). Podstawowy żel otrzymano z mieszaniny: TEOS-Si(OC₂H₅)₄; Ca(NO₃)₂·4H₂O; OP(C₂H₅O)₃; C₂H₅OH; 2N HNO₃ jako katalizator reakcji hydrolizy. Ten hydrolizat mieszało około 2 godzin. Potem hydrolizat domieszkowano Fe₂O₃ lub CuCO₃ i mieszało 15 min. Metodą spin-coating pokrywano szkiełka mikroskopowe. Wysuszone próbki były grzane z predkością 2°C/min do 550°C i przetrzymane około 2 godzin. Próbki zawierające srebro były domieszkowane po otrzymaniu bioszkieła.

Zdolność specjalnych mikroorganizmów takich jak bakterie lub grzyby do otrzymywania cząstek metalicznych jest znana. Syntezę nanocząstek poprzez grzyby *Penicillium* opisano w pracy Sadowski et al. [3] Otrzymana biomasa grzybowa użyta w biosyntezie rosła w cieczy zawierającej: 7g/l KH₂PO₄; 2 g/l K₂HPO₄; 0,1 g/l MgSO₄·7H₂O; 1g/l (NH₄)₂SO₄; 0,6 g ekstraktu drożdży i 10 g glukozy.

Próbki bioszkieła były zanurzone w cieczy zawierającej nanocząsteczki srebra przez 7 dni, w temp. pokojowej w zamkniętym naczyniu bez dostępu światła. Obecność brązowego koloru na powierzchni szkła wskazywała, że srebro koloidalne pokryło bioszkieło. Próbki poddano działaniu płynu SBF (symulowany roztwór fizjologiczny) przez okres 7 dni w temperaturze 37°C, pH płynu wynosiło 7,3.

Bakteriami, które posiewano był gronkowiec złocisty (SA), czyli *Staphylococcus aureus* i pałeczka ropy błękitnej (PA), czyli *Pseudomonas aeruginosa*. Do badań wykorzystano 24 godzinne bulionowe hodowle obu szczepów. Hodowlę bakterii prowadzono na podłożu płynnym w bulionie odżywczym. Podłoże było sterylizowane w autoklawie w temperaturze 121°C pod ciśnieniem 1,5 atmosfery przez 20 minut. Do 5 ml sterylnego bulionu odżywczego dodano 1 ml badanej hodowli i w takiej zawieszynie umieszczono próbki bioszkieła. Całość poddano inkubacji przez 5 dni, w cieplarni, w temperaturze odpowiednio 37°C dla gronkowca złocistego i 28°C dla pałeczki ropy błękitnej. Po 5 dniach próbki bioszkieła wyjęto z hodowli bakteryjnych i poddano sterylizacji. Po sterylizacji próbki bioszkieła wraz z próbkami kontrolnymi (bez sterylizacji) ponownie umieszczono w bulionie odżywczym i inkubowano przez okres 24 godzin. Następnie zmierzono gęstość optyczną hodowli OD 550nm za pomocą spektro-

in metal corrosion. It has been demonstrated that strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* possess enzymes that can destroy metals. The contact between the material and bacteria may occur through one of three pathways: direct contamination, contiguous spread and hematogenous spread. Experimental investigations into bacterial colonization of biomaterial were conducted by Gristina et al. [2]. *S. aureus* showed a preference for metals rather than polymers. The antibacterial effects of silver doped silica thin films on *E. coli* and *S. aureus* were examined by the film attachment method. The coating films had an excellent antibacterial performance [3]. It has observed that a silver coating on orthopedic external fixation pins reduces the adhesive action of *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *S. aureus*. [4] The resistance of biomaterials surface to infections can be maintained by sterilization, antibiotic impregnation or by improving the colonization by host tissue cells [1].

In the present study the bioglass thin films doped with silver, copper and iron were successfully prepared by the sol-gel method to be applied to antibacterial materials.

Here, we report on experimental enquires into physical processes which govern the efficiency of sterilization by UV.

Materials

In agreement with procedures proposed by Hensch group [8,9], bio-gel glasses with the nominal compositions $36\text{CaO} \cdot 60\text{SiO}_2 \cdot 4\text{P}_2\text{O}_5$ (mol%) were obtained as a G- sample.

The basic gel has been prepared from the mixture of: tetraethoxysilane TEOS-Si(OC₂H₅)₄; calcium nitrate tetrahydrate Ca(NO₃)₂·4H₂O dissolved in distilled water; triethylphosphate OP(C₂H₅O)₃ dissolved in ethanol C₂H₅OH used as an organic solvent; 2N acid HNO₃ as a catalyst of the reaction of hydrolysis. The hydrolyzate components were mixed for about 2 hours. Then the hydrolyzate was doped with Fe₂O₃ or CuCO₃ and mixed for 15 min. The coated microscopic glass substrates gelation was obtained by the spin-coating method. The gel is then subjected to controlled thermal processes; aged at 60°C for 72 h, dried in an oven with a cycle ending at 120°C. All the dried composites were heated in air at 2°C/min speed to 550°C and kept for about 2 hours. After the process of the bioglass formation, the samples were doped with silver nanoparticles.

The ability of certain microorganisms, such as bacteria or fungi, to control the synthesis of metallic nanoparticles should be available. The extracellular synthesis of silver nanoparticles by the fungus *Penicillium* was described by Sadowski et al. [4]. A fungal biomass preparation used for biosynthesis experiments was grown in liquid medium, containing 7g/l KH₂PO₄; 2 g/l K₂HPO₄; 0,1 g/l MgSO₄·7H₂O; 1g/l (NH₄)₂SO₄; 0,6 g yeast extract; 10 g glucose.

Bioglass samples were kept for 7 days in 5 ml of the liquid with silver nanoparticles. The bonding process of silver particles with bioglass samples took place in the room temperature, in a closed vessel, without light. The appearance of brown color on the surface of bioglass samples indicated that biomaterials were covered by colloidal silver particles. Afterwards, the samples were dried at 40°C for 24h.

The bacteria tested were Gram-positive strains (*Staphylococcus aureus* - Polish Collection of Microorganisms (PCM) 9944) and Gram-negative rods of *Pseudomonas aeruginosa* (PCM 2124).

To the 5 ml of sterile clear soup, 1 ml of investigated culture was added, and in such suspension some samples of bioglass were placed. Then the whole mixture was incu-

TAB.1. Gęstość optyczna hodowli pałeczki ropy błękitnej i gronkowca złocistego po kontakcie z próbkami bioszkieł.

TAB.1. Mean values of optical density (OD) of the solution of *P.aeruginosa* and *S. aureus* culture after doped-bioglasses contact

	Próbka Sample G	Próbka Sample G+Fe	Próbka Sample G+Cu	Próbka Sample G+Ag
PA	0,54	0,40	0,39	0,31
SA	0,62	0,67	0,55	0,39

fotometru Spekol 11.

Próbki różnią się między sobą składem. Działaniu hodowli poddane zostały próbki z domieszką srebra (G+Ag), miedzi (G+Cu), żelaza (G+Fe), oraz próbki niedomieszkowane (G). Określona została gęstość optyczna hodowli bakteryjnych, przy długości fali 550 nm, w których przebywały próbki bioszkieł. Im większa liczba komórek bakterii w roztworze tym znaczniejsza mętność, ponieważ ilość światła rozpraszane go przez komórki jest wprost proporcjonalna do ich liczby. Uzyskane rezultaty badań adhezji pałeczki ropy błękitnej umieszczone zostały w TABELI 1.

Można zauważyć, że gęstość optyczna kultur bakterii, w którym znajdowały się próbki nie zawierające domieszek (G) jest znacznie większa niż dla bulionu z domieszkowanymi próbkami. Może to świadczyć o tym, że miedź, żelazo oraz srebro dodane do bioszkieł utrudniają pałeczkom ropy błękitnej (PA) oraz gronkowca złocistego kolonizację powierzchni materiału.

W przypadku próbek przebywających w hodowli gronkowca złocistego, próbki zawierające żelazo zostały zasiedlone przez bakterie w większym stopniu, niż szkło kontrolne. Świadczy o tym większa gęstość optyczna dla próbek z żelazem (G+Fe) niż dla próbki czystej (G) i innych (TAB.1). Zaistniała sytuacja może wynikać z natury gronkowca złocistego. Bakterie ta chętnie rozmnażają się i tworzą biofilm w środowisku zawierającym żelazo. Gęstość optyczna hodowli bakteryjnych, w których znajdowały się próbki zawierających srebro, niezależnie od rodzaju drobnoustrojów, osiąga zawsze wartości najniższe. Oznacza to, że adhezja bakterii do powierzchni, która w swym składzie zawiera srebro, jest znacznie spowolniona. Wpływ miedzi na adhezję bakterii do powierzchni bioszkieł jest również zauważalny. Wartości gęstości optycznej dla próbek z miedzią (G+Cu) są zawsze niższe niż wartości dla próbek czystych (G) oraz z domieszką żelaza (G+Fe), jednak nie spadają poniżej wartości ekstynkcji uzyskanych dla próbek z domieszką srebra (G+Ag). Oznacza to, że miedź w mniejszym stopniu niż srebro spowalnia tworzenie się biofilmu na powierzchni tworzywa, ale przeciwdziała kolonizacji podłoża skuteczniej niż żelazo.

Sterylizacja

Każde urządzenie, które zostaje wprowadzone do organizmu, musi być sterylne. Procesy sterylizacji są często prowadzone za pomocą promieniowania UV. Oddziaływanie między promieniowaniem, a bakterią jest oparte na zmianie indukowanej w łańcuchach DNA mikroorganizmów, które blokują metabolizm komórkowy i reprodukcję [1]. Sterylizowane za pomocą lampy UV były wszystkie próbki. Wyniki pomiarów gęstości optycznych poszczególnych hodowli

TAB.2. Przeżywalność gronkowca złocistego po sterylizacji promieniowaniem ultrafioletowym
TAB.2. Survival rate of bacteria after the sterilization by ultraviolet radiation

OD	Sample G		Sample G+Cu		Sample G+Ag		Sample G+Fe	
	Average	%	Average	%	Average	%	Average	%
Control sample	0,62	100	0,55	100	0,39	100	0,67	100
5 min	0,29	46	0,31	57	0,38	86	0,21	31
15 min	0,35	56	0,17	31	0,29	74	0,30	45
30 min	0,11	18	0,14	25	0,31	78	0,34	51
60 min	0,19	31	0,15	27	0,20	50	0,35	52

bated for 5 days, at 37°C for *S. aureus* and at 28°C for *P. aeruginosa*. After 5 days the bioglass samples were taken out from bacteria cultures and sterilized. Next, the bioglass samples (and control samples) were placed in clear soup and incubated for 24 h. Finally, the optical density (OD) of each clear soup was measured for 550nm on a spectrophotometer Spekol 11.

Samples are differentiated as far as the basic composition of the dopants is concerned. *S. aureus* and *P. aeruginosa* were inoculated on silver-doped (G+Ag), copper-doped (G+Cu), iron-doped (G+Fe) and undoped (G) bioglass. The optical density of a solution indicated the formation of a bacterial colony. Taking into account the number of bacteria which stuck to biomaterial creating a biofilm, the quantity of light dispersed by cells is directly proportional to the number of bacteria (optical density OD).

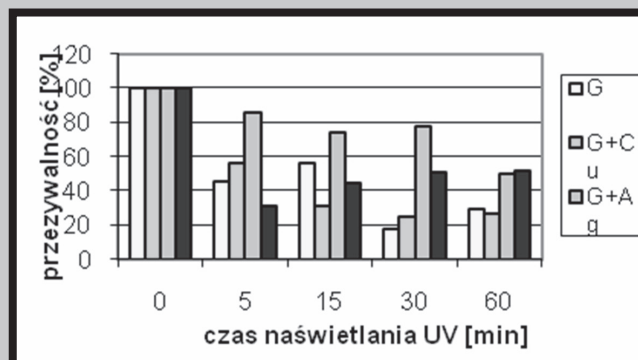
The results of an investigation into bacterial adhesion are presented in TAB.1. It may be observed that optical density of bacteria cultures in samples without dopants (G) is much higher than in clear soup with doped samples. It may be a proof that copper, iron and silver added to bioglasses make the colonization of the material surface difficult for *P. aeruginosa*.

The admixtures of silver and copper also slow down the growth of *Staphylococcus*. Yet the introduction of iron does not bring about the same effect; on the contrary, these bacteria quickly propagate and create a biofilm in iron-containing medium (TABLE 1 – the highest value of OD). This element is here a factor determining pathogeny. Materials containing this metal are a good base for *Staphylococcus*. Optical density of bacteria cultures in samples doped with silver, independent of the type of microorganisms, always reaches the lowest values. It means that the adhesion of bacteria to the surface containing silver is significantly slowed down. Copper slows down the growth of a biofilm on the surface of materials. In a smaller degree than silver, but it stops the colonization more effectively than iron. Independent of the type of bacteria, the obtained results are similar.

Sterilization of biomaterials

Any device that is to be implanted into the body must comply with sterile conditions. Thus the sterilization procedures are the UV radiation. Interactions between radiation and bacteria are based on the alterations induced on the DNA chains of the microorganisms, with the block of the cell metabolism or reproduction [1].

The results of measurements concerning optical density of particular cultures were averaged and placed in TABLE 2. The survival of bacterial cultures after the contact with



RYS. Przeżywalność gronkowca złocistego po sterylizacji promieniowaniem ultrafioletowym
FIG. Survival rate of bacteria after the sterilization by ultraviolet radiation

zostały uśrednione i umieszczone w jednej tabeli (TAB.2.). Wyznaczona została również przeżywalność hodowli bakterierynych po kontakcie z bioszklami. Przeżywalność wyrażona w procentach określa ile drobnoustrojów przetrwało proces sterylizacji i w okresie doby po sterylizacji rozmnożyło się w bulionie odżywczym. Rezultaty zostały przedstawione również na wykresie słupkowym.

Po naświetlaniu UV próbek przez okres 5, 15, 30 i 60 minut obserwujemy zupełnie inny wpływ domieszek na rozwój bakterii niż przed sterylizacją. Również czas ekspozycji na promienie ma wpływ na uzyskany efekt. Początkowo, przed sterylizacją, w próbce kontrolnej dla bioszkl z srebrem znajdowała się najmniejsza ilość gronkowca złocistego. Po sterylizacji UV przez okres 5 minut najmniejszą gęstość optyczną obserwujemy dla hodowli odpowiadającej próbce zawierającej żelazo, naświetlanie przetrwało tylko 31% bakterii. Ten sam efekt dla materiału zawierającego miedź został osiągnięty dopiero po 15 min. Jednak wśród bioszkieł naświetlanych 15 minut najlepsze działanie antybakteryjne wykazuje miedź. Przy tak krótkim czasie naświetlania nie obserwujemy antybakteryjnego działania srebra. Mała dawka promieni UV oraz obecność srebra prawdopodobnie spowodowała uruchomienie u bakterii mechanizmów obronnych i przyspieszenie metabolizmu.

Bakterie w sytuacji zagrożenia zaczęły rozmnażać się szybciej. Działanie bakterioobójcze srebra jest widoczne dopiero po 60 min. naświetlania UV. W przypadku bioszkieł domieszkowanych miedzią, liczebność spada równomiernie, już po 5 minutach pozostała tylko połowa hodowli. Analizując wyniki badań gęstości optycznej hodowli odpowiadających bioszklom z różnymi pierwiastkami w składzie, nie można zaobserwować równomiernego spadku liczebności mikroorganizmów, za wyjątkiem próbek domieszkowanych miedzią. Nie jest możliwe określenie jednego optymalnego czasu, po którym wyginęłyby wszystkie drobnoustroje. Im dłużej bioszklka pozostawały pod działaniem ultrafioletu tym więcej drobnoustrojów przeżyło na ich powierzchni. Może to oznaczać, że bakterie przyzwyczały się do panujących warunków, wytworzyły mechanizmy obronne i przetrwały napromieniowanie ultrafioletem. Aby uniknąć takiej sytuacji można próbować sterylizować materiały kilkakrotnie przez okres kilku minut. Być może wówczas drobnoustroje nie zdążą przystosować się do zaistniałych warunków i kolejna dawka promieniowania spowoduje ich wyginiecie. Oceniając efekt sterylizacji po czasie 60 minut, można zauważyć że we wszystkich przypadkach wyginęło 50% i więcej drobnoustrojów. Najlepszy efekt uzyskano dla bioszklki z domieszką żelaza. Mimo iż z kontroli adhezji wynika, że żelazo przyspiesza rozmnażanie się drobnoustrojów. Można stwierdzić, że żelazo w połączeniu z promieniowaniem ultrafioletowym jest skutecznym środkiem sterylizującym.

bioglasses (FIG.2) was also calculated. The survival rate show how many microorganisms survived the sterilization and after twenty-four hours reproduced in clear soup.

After the UV irradiation of samples for 5, 15, 30 and 60 min the influence of dopants on bacterial growth is completely different than before the sterilization. The time of exposition of irradiation has an influence on the obtained result.

Initially, before the sterilization, the control sample for a silver-doped bioglass contained the smallest amount of *S.aureus*. After the UV sterilization which lasted 5 min, the lowest optical density is observed in the culture of an iron-doped sample. For the material containing copper, the same effect was achieved only after 15 min. However, copper is characterized by the highest antibacterial activity among the bioglasses irradiated for 15 min. The result for a sample containing silver is even higher.

During such a short time of irradiation we can not see the antibacterial activity of silver. Small doses of UV irradiation induce a silver-matrix cation exchange and the antibacterial effect disappears. If silver containing samples were exposed to UV irradiation, they would change their color. This is because Ag^+ ions were not completely trapped in the silica matrix and a bioglass network also was not completely densified. Probably, a small dose of UV irradiation and the presence of silver triggered the defense mechanisms in bacteria and accelerated their metabolism. When threatened, bacteria started to reproduce quicker. The antibacterial activity of silver is clearly seen only after 60 min of irradiation. The number of *S. aureus* dropped by half. In the case of bioglass containing copper, the reduction of bacteria after UV sterilization was proceeding steadily and after a 5 min exposure and a 24-hour incubation, it amounted to approximately 50% against *S. aureus*. After 1 hour of UV sterilization, the reduction of bacteria was about 73%. Analyzing the results of researches into the optical density of cultures corresponding to bioglasses containing various elements, it is not possible to calculate one optimal time after which all the microorganisms would be killed. The longer the bioglasses were under the influence of ultraviolet, the more microorganisms survived on their surfaces. It may mean that bacteria adjusted to external conditions, worked out their defense mechanisms and survived the ultraviolet irradiation. To avoid such a situation, the materials should be sterilized several times, for several minutes. Maybe the microorganisms will not get used to the conditions and the following dose of irradiation will cause their extinction.

Estimating the effect of sterilization after 60 minutes, it can be seen that 50% and more microorganisms died in all cases. The best result was achieved for the iron-doped bioglass. A thorough enquiry into the mechanism of adhesion has shown that iron accelerates the reproduction of microorganisms. Nevertheless, it also appears that iron together with ultraviolet radiation is an effective sterilizer.

Piśmiennictwo

- [1]. Giardino R, Aldini NN, Infection and sterilization, in: Integrated Biomaterials Science (R.Barbucci, ed.), Kluwer Academic, New York, 2002;815-832
- [2]. Hyung-Jun J, Sung-Chul Y, Seong-Geun O, Preparation and antibacterial effects of $Ag-SiO_2$ thin films by sol-gel method, Biomaterials 2003; 24: 4921-4928
- [3]. Sadowski Zygmunt, Maliszewska Irena.: Biosynthesis of silver nanoparticles using microorganisms, X Ukrainian-Polish Symposium. Proceedings, Lviv-Uzliissia, 2006; 77-80

References

- [4]. Szarska S, Kaźmierczak J, Matyasik M, Barwiński B, Stręk W, Spectroscopic studies of Cu^{2+} and Fe^{2+} ions in sol-biogel material, Radiation Measurement, in press.
- [5]. Pereira MM, Clark AE, Hench LL, Calcium phosphate formation on sol-gel-derived bioactive glasses in vitro, J Biomed Mater Res.,1994;28: 693-698
- [6]. Jones JR, Hench LL, Factors affecting the structure and properties of bioactive foam scaffolds for tissue engineering, J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater 2004; 68B: 36-44

ZASTOSOWANIE HYDROŻELI Z LUDZKIEJ ALBUMINY JAKO POWŁOKI USZCZELNIAJĄCE PROTEZY NACZYNIOWE

ANNA SZULC^{1*}, KATARZYNA WALENKO²,
MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEL², TOMASZ CIACH¹

¹POLITECHNIKA WARSZAWSKA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII CHEMICZNEJ I PROCESOWEJ,
LABORATORIUM INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ, WARSZAWA, POLSKA,
²WARSZAWSKI UNIwersYTET MEDYCZNY, ZAKŁAD BIOFIZYKI I
FIZJOLOGII CZŁOWIEKA, WARSZAWA, POLSKA
*MAILTO: A.SZULC@ICHIP.PW.EDU.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 51-53]

Wstęp

Protezy naczyniowe są szeroko stosowane w chirurgii w celu zastąpienia uszkodzonych lub pomostowania zablokowanych naczyń krwionośnych. Stosowanie sztucznych naczyń jest mniej inwazyjne niż autografting, ze względu na brak dodatkowych zabiegów chirurgicznych związanych z pobraniem autologicznej żyły. W praktyce klinicznej częściej stosowane są protezy dziane ze względu na wysoką porowatość, co wspomaga gojenie, ale z drugiej strony powoduje krwotoki [1]. Aby uniknąć tych komplikacji, przed operacją protezy są uszczelniane poprzez zanurzenie we krwi pacjenta, co sprzyja wzrostowi neointimy [2]. Ta procedura wymaga pobrania znacznej ilości krwi pacjenta, ponadto powstała na powierzchni protezy warstwa skrzepiny jest trombogenna. Dlatego coraz częściej stosowane są protezy z gotową impregnacją z białek zwierzęcych (kolagen, żelatyna), usieciowanych formaldehydem lub aldehydem glutarowym [3],[4], które charakteryzują się wysoką toksycznością. Dlatego też podejmowane są badania mające na celu opracowanie nietoksycznych powłok hydrożelowych o właściwościach przeciwwzakrzepowych. W pracy opisano właściwości biomateriału hydrożelowego przygotowanego z ludzkiej albuminy (Alb) usieciowanej utlenionym dekstranem (DexOx) i jego aplikację jako powłoczenie uszczelniające protezy naczyniowe. Powszechnie wiadomo, że albumina ogranicza adhezję płytek krwi i obniża trombogeniczność zatem wydaje się być idealnym substratem jako powłoka protezy naczyniowej.

Materiały i metody

DexOx otrzymano poprzez częściowe utlenienie dekstranu ($M_w=70kDa$) przy użyciu nadjodanu oraz następnie oczyszczanie produktu reakcji poprzez dializę [5]. Stopień utlenienia oznaczono przy użyciu chlorowodoru hydroksyloaminy [6]. Hydrożele zostały przygotowane poprzez zmieszanie roztworów DexOx i Alb o stężeniu 5 i 10% w odpowiednich proporcjach (2:8; 5:5; 8:2). Badania zdolności do pochłaniania wody oraz szybkość degradacji przeprowadzono w środowisku buforu PBS. Morfologię otrzymanych hydrożeli oceniono przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego. Zweryfikowano również cytotoksyczność hydrożeli i ich produktów degradacji oceniając przeżywalność ludzkich fibroblastów za pomocą testu XTT.

Kawałki protezy dakronowej zostały pokryte przez zanurzenie różnymi powłokami hydrożelowymi. Zbadano przepuszczalność wody uszczelnionych protez naczyniowych.

APPLICATION OF HYDROGELS COMPOSED OF HUMAN SERUM ALBUMIN FOR DACRON VASCULAR GRAFT SEALING

ANNA SZULC^{1*}, KATARZYNA WALENKO²,
MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEL², TOMASZ CIACH¹

¹WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
FACULTY OF CHEMICAL AND PROCESS ENGINEERING,
BIOMEDICAL ENGINEERING LABORATORY, WARSAW, POLAND
²MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, DEPARTMENT OF BIOPHYSICS
AND HUMAN PHYSIOLOGY, WARSAW, POLAND
*MAILTO: A.SZULC@ICHIP.PW.EDU.PL

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 51-53]

Introduction

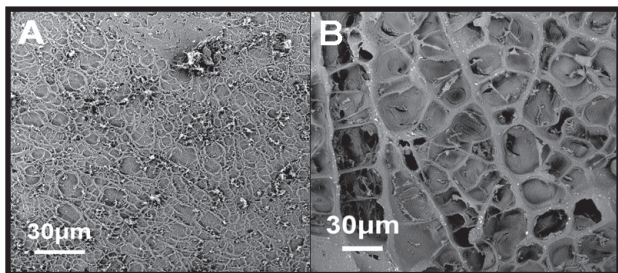
Vascular grafts are widely applied in surgery to bypass or replacement a segment of diseased artery. Application of such artificial vessel is also less invasive than autografting, due to the lack of additional autograft vane sampling surgical procedure. Knitting grafts are more frequently used clinically because of their high porosity, what supports healing, but on the other hand causes bleeding [1]. Thus, before the surgery, graft is sealed with the patient blood clot what encourages the growth of neointima [2]. Unfortunately, this procedure demands additional amount of patient's blood and creates thrombogenic surface. Therefore, vascular prosthesis are pre-sealed with coatings from animal proteins (collagen, gelatin), crosslinked with formaldehyde or glutaraldehyde [3], [4], which are known for their toxicity and cancerogenic properties. Thus, a new type of hydrogel which does not produce toxic effects or inflammatory response, and have antithrombogenic properties is needed. As an example, the hydrogel biomaterials for vascular graft's sealing, preparing from human albumin serum (Alb) cross-linked with oxidized dextran (DexOx) is described in this study. It is generally known that native albumin limits the platelet adhesion and decreases thrombogenicity, so seems to be a perfect substrate as a vascular graft coating.

Materials and methods

DexOx was prepared by partial periodate oxidation of dextran ($M_w=70kDa$) followed by the dialysis purification [5]. The oxidation degree of DexOx was determined by hydroxylamine hydrochloride method [6]. Hydrogels were prepared by mixing DexOx and Alb solutions (5% and 10%) in different ratios (2:8, 5:5, 8:2). Swelling and degradation studies were conducted in PBS. A porous structure was examined under scanning electron microscopy (SEM). Cell viability studies were performed using XTT assay to verify the cytocompatibility of both hydrogels and their degradation byproducts. The pieces of Dacron vascular graft were dip coated with various hydrogels. Obtained composite grafts were subjected to water permeability tests at elevated pressure (120 mmHg).

Results and discussion

The DexOx/Alb hydrogels were transparent and brownish in colour. FIG.1 depicted SEM image of dried hydrogels, revealing highly porous structure. There is an observable influence of the DexOx content to the networks construction



RYS.1. Zdjęcia SEM hydrożeli: A. 2:8; B. 8:2 DexOx/Alb

FIG.1. SEM image of A. 2:8; B. 8:2 DexOx/Alb hydrogel

Wyniki i dyskusja

Na RYS.1 przedstawiono zdjęcia SEM obrazujące strukturę. Zauważono, że wraz ze wzrostem zawartości DexOx struktura hydrożelu jest bardziej porowata.

Zdolność do pochłaniania wody zależy od gęstości wiązań w hydrożelu a tym samym od zawartości DexOx. Dla hydrożelu zawierającego 60% DexOx, stosunek liczby grup aldehydowych do liczby dostępnych grup aminowych jest równa 1, co skutkuje wysoką gęstością wiązań a tym samym niską zdolnością do pochłaniania wody. Nadmiar jednego rodzaju grup zdolnych do utworzenia wiązania powoduje niższą gęstość wiązań a tym samym wysoką zdolność do pochłaniania wody.

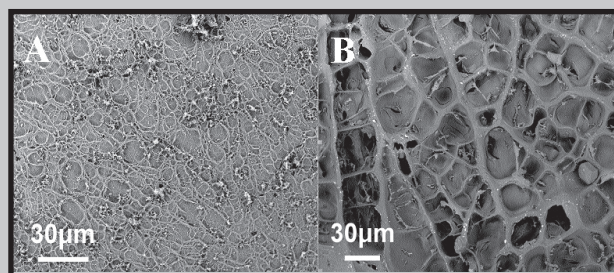
Degradację in vitro hydrożeli powstałych z 5 i 10% roztworów (2:8; 5:5; 8:2) oceniono mierząc ubytek masy. Na RYS.2 przedstawiono wyniki degradacji hydrożeli przygotowanych z 10% roztworów. Hydrożele degradowały na drodze nie enzymatycznej hydrolizy. Najszybsze ubytki masy zaobserwowano w czasie pierwszych 3 dni, potem degradacja była wolniejsza. Otrzymane wyniki wskazują na zależność szybkości degradacji od zarówno gęstości usieciowania czyli od stosunku DexOx i Alb, jak również od podatności na hydrolizę obu substratów. Profil degradacji 5-DexOx-I/Alb był bardzo podobny do przedstawionego na RYS.2, z tymże szybkość degradacji była dwa razy większa.

Biozgodność hydrożeli DexOx-I/Alb (2:8; 5:5; 8:2) została zbadana przy użyciu metody XTT. Przeżywalność komórek była oceniana 2, 7 i 14 dnia hodowli. Wartości przeżywalności w 2 dniu wynosiły od 47 do 79% kontroli (fibroblasty na dnie studzienki). Uzyskane rezultaty pokazują, że większość z badanych hydrożeli nie wykazuje toksycznego działania na komórki. Obserwacje mikroskopowe hodowli potwierdzają te wyniki – komórki na powierzchni biomateriałów miały morfologię typową dla prawidłowych fibroblastów.

Wysuszone, pokryte hydrożelami grafty były sztywniejsze niż niepokryte, jednak po zanurzeniu w roztworze soli fizjologicznej na kilka minut stawały się miękkie i rozciągliwe. Zbadano przepuszczalność pokrytych graftów aby określić efektywność hydrożeli jak pokryć uszczelniających. Zastosowanie drugiej warstwy pokrycia spowodowało redukcję przepuszczalności poniżej 1ml/cm²/min, podczas gdy przepuszczalność graftów niepokrywanych wynosiła ok. 1400 ml/cm²/min.

Wnioski

Przedstawione wyniki pokazują, że hydrożele DexOx-I/Alb charakteryzują się różnym stopniem pochłaniania wody oraz szybkością degradacji w zależności od stosunku oksydowanego dekstranu i albuminy. Zastosowanie tego typu hydrożeli jako pokryć uszczelniających grafty naczyniowe



RYS.2. Degradacja hydrolityczna hydrożeli

FIG. 2. Hydrolytic degradation of 10-DexOx/Alb hydrogels (ratio 8:2, 2:8, 5:5)

and appearance.

Obtained results of swelling ratio studies showed that it depends on crosslinking density. For DexOx/Alb hydrogels, somewhere around 60% of DexOx content, the ratio of aldehyde groups in DexOx to available amine groups in Alb is equal to 1. This results in the high crosslinking densities so in the lowest swelling ratio. Excess of either aldehyde groups or amine groups in the preparation leads to the lower crosslinking densities so to the higher swelling ratios.

In vitro degradation of 5% and 10% DexOx/Alb hydrogels (ratio 2:8, 5:5, and 8:2) was examined by determining the weight loss of the hydrogels at 37°C. DexOx/Alb hydrogels degraded due to the simple, non enzymatic hydrolysis. As shown in FIG.2, the mass losses were faster in the first 3 days, and then degradation slowed down. Obtained results showed that hydrolytic degradation depended on both crosslinking density, thus on on the relative amount of DexOx and Alb used in their preparation; as well as hydrolytic susceptibility of DexOx and Alb. Degradation profiles of 5-DexOx-I/Alb was very similar to those depicted in FIG.2, but the degradation process was about two fold faster.

The cytocompatibility of DexOx-I/Alb (2:8, 5:5, and 8:2) hydrogels and their degradation byproducts were evaluated by performing XTT assay. The cell viability (human fibroblasts) was examined on days 2, 7 and 14 respectively. Obtained results showed that the majority of developed hydrogels did not display toxic properties. The viability values on 2 day ranged from 47 to 79% of control cells (fibroblasts on culture plate). Observation of cells during the culturing revealed morphology typical for correctly developing fibroblasts.

Dried coating grafts were stiffer than uncoated. When immersed in saline for a few minutes they became soft and flexible as without the coating. The measurements of water permeability of composite grafts were fundamental to appraise the effectiveness of hydrogels as sealants. The water permeation value obtained for unsealed grafts was about 1400 (ml/cm²/min). Single DexOx/Alb hydrogels coating drastically decreases water permeability hydrogels. Application of the second coating layer (preparing from 10% solutions) reduced water permeability below 1ml/cm²/min.

Conclusions

Our study showed that DexOx/Alb hydrogel have different swelling behaviour and degradability depending on the ratio of the crosslinker to the protein. Application of these

pozwała uzyskać szczelne grafty, gotowe do użycia bez konieczności przeprowadzania pre-clottingu. Po implantacji, pokrycie hydrożelowe ulega stopniowej degradacji ułatwiając tym samym przerost tkanki przez ściany protezy. To zastosowanie może być również korzystne ze względu na fakt, że albumina jest naturalnym składnikiem krwi oraz zapobiega adhezji trombocytów.

Podziękowania

Niniejsze badania zostały sfinansowane z Projektu Polskiego Sztucznego Serca.

hydrogels as Dacron graft coating provides a ready to use leakage free vane prosthesis without the need of pre-clotting. After implantation, the hydrogel coating degrades gradually allowing tissue ingrowth. This application can be beneficial due to the fact, that albumin is a natural component of blood and is known to prevent protein and thrombocytes adhesion.

Acknowledgments

Presented research was financially supported by the Polish Artificial Heart Project.

Piśmiennictwo

- [1] Phaneuf MD, Dempsey DJ. et al. Coating of Dacron vascular grafts with an ionic polyurethane: a novel sealant with protein binding properties. *Biomaterials*, 22(5):463-469, March 2001.
- [2] Sheehan SJ, Rajaha SM, Kesterb RC. Effect of preclotting on the porosity and thrombogenicity of knitted Dacron® grafts. *Biomaterials*, 10(2):75-79, March 1989.
- [3] Robert G. et al. Collagen coatings as biological sealants for textile arterial prostheses. *Biomaterials*, 6(1):64-67, January 1985.

References

- [4] Yasim A, Gul M, Ciralik H. and Ergun Y. Gelatin-Sealed Dacron graft is not more susceptible to MRSA infection than PTFE graft. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 32(4):425-430, October 2006.
- [5] Fuentes, M, Segura RL. et al.: Determination of protein-protein interactions through aldehyde-dextran intermolecular cross-linking. *Proteomics*, 4(9):2602-2607, September 2004.
- [6] Zhao H, Heindel ND. Determination of degree of substitution of formyl groups in polyaldehyde dextran by the hydroxyamine hydrochloride method. *Pharm Res*, 8(3):400-402, March 1991.

WŁAŚCIWOŚCI POWIERZCHNIOWE WYBRANYCH MATERIAŁÓW CHITOZANOWYCH

ALINA SIONKOWSKA, JUSTYNA KOZŁOWSKA*, ANNA PŁANECKA,
JOANNA SKOPIŃSKA-WIŚNIEWSKA, PAULINA ŁOŚ

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU,
WYDZIAŁ CHEMII, ZESPÓŁ BIOPOLIMERÓW,
UL. GAGARINA 7, 87-100 TORUŃ, POLSKA

*MAILTO: JUSTYNAK@CHEM.UMK.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 53-55]

Wprowadzenie

Materiały na bazie chitozanu charakteryzują się wysoką biokompatybilnością oraz bardzo cennymi właściwościami biologicznymi – chitozan m.in. przyspiesza gojenie się ran, posiada właściwości antybakteryjne, jest biodegradowalny i nietoksyczny. Z chitozanu stosunkowo łatwo można otrzymać materiał w postaci żelu, membrany, nanowłókna, mikro- i nanocząsteczek, skafoldu, czy też gąbki. [1]. Z tego powodu znalazł on szerokie zastosowanie w medycynie (m.in. w produkcji implantów, opatrunków na rany i oparzenia oraz jako nośnik preparatów o kontrolowanym działaniu) [2, 3]. Właściwości fizyczne i chemiczne chitozanu zależą przede wszystkim od jego ciężaru cząsteczkowego oraz stopnia deacetylacji. Chitozan jest polimerem podatnym na degradację, m.in. utleniającą, hydrolityczną, termiczną, czy też degradację ultradźwiękami [4].

SURFACE PROPERTIES OF DIFFERENT CHITOSAN MATERIALS

ALINA SIONKOWSKA, JUSTYNA KOZŁOWSKA*, ANNA PŁANECKA,
JOANNA SKOPIŃSKA-WIŚNIEWSKA, PAULINA ŁOŚ

NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY,
FACULTY OF CHEMISTRY, BIOPOLYMER RESEARCH GROUP,
7 GAGARINA STREET, 87-100 TORUN, POLAND TORUN

*MAILTO: JUSTYNAK@CHEM.UMK.PL

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 53-55]

Introduction

Chitosan is a natural biopolymer, usually prepared from chitin. Chitosan-based materials possess high biocompatibility and various biological functions such as wound healing, antibacterial activity, biodegradability and non-toxicity. Chitosan is easily processed into gels, membranes, nanofibers, beads, microparticles, nanoparticles, scaffolds and sponges forms [1]. For this reason, chitosan is regarded as one of the most useful natural biomaterials (eg. wound dressings, drug delivery systems, space filling implants) [2, 3]. Physical and chemical properties of chitosan depend strongly on the molecular weight and the degree of deacetylation. Chitosan is sensitive to various types of degradation such as oxidative, hydrolytic, thermo-, photo- and ultrasonic-degradation [4].

Chitozan, glutation i kamforochinon zakupiono w firmie Sigma-Aldrich. Fenyloalanina została kupiona w firmie Fluka. Otrzymano roztwór chitozanu o stężeniu 0,5%, poprzez rozpuszczenie odpowiedniej ilości chitozanu w 0,1 M kwasie octowym. Mieszanki chitozan/glutathion, chitozan/fenyloalanina oraz chitozan/kamforochinon otrzymano przez rozpuszczenie odpowiednich ilości glutathionu, fenyloalaniny i kamforochinonu w roztworze chitozanu. Stosunek wagowy chitozanu do dodanego składnika w otrzymanych mieszaninach wynosił 99,9:0,1. Filmy uzyskano metodą wylewania na płytki szklane. Po odparowaniu rozpuszczalnika błony pozostawiono do suszenia w temperaturze pokojowej.

Otrzymane filmy chitozanu oraz jego mieszanin poddano działaniu promieniowania emitowanego przez lampę ksenonową Suntest XLS (długość fali 300-800 nm), w temperaturze 35°C. Czas ekspozycji na promieniowanie wynosił 480 h.

Właściwości powierzchniowe filmów chitozanowych i mieszanin przed i po działaniu promieniowania słonecznego zanalizowano metodą pomiaru kąta zwilżania oraz obliczenia swobodnej energii powierzchniowej i jej składowych: dyspersyjnej (γ_s^d) i polarnej (γ_s^p) metodą Owensa-Wendta. Kąt zwilżania zmierzono przy pomocy goniometru G 10/DSA 10 niemieckiej firmy Krüss. Do pomiarów zastosowano dwie cieczy: diiodometan i glicerynę. Pomiarów dokonywano bezpośrednio po naświetlaniu próbek, w temperaturze pokojowej i w atmosferze powietrza. Podana wartość kąta zwilżania jest średnią z 10 pomiarów.

W celu analizy powierzchni badanych filmów zastosowano mikroskop sił atomowych AFM (NanoScope IIIa, mikroskop MultiMode) ze skanującą sondą SPM (Digital Instruments Veeco Metrology Group, Santa Barbara, CA). Badania przeprowadzano w trybie przerywanego kontaktu (Tapping Mode), w atmosferze powietrza.

Wyniki i ich omówienie

W TABELI 1 podano wyniki pomiaru kąta zwilżania powierzchni badanych filmów przy użyciu cieczy niepolarniej (diiodometanu) i cieczy polarnej (gliceryny).

Wartości kątów zwilżania nienaświetlanych filmów uzyskane dla mieszanin są bardzo zbliżone do uzyskanych dla czystego chitozanu. Po napromienianiu badanych filmów obserwuje się znaczne zmniejszenie wartości kątów zwilżania kroplą gliceryny i tylko niewielkie zmniejszenie wartości kątów zwilżania uzyskane w przypadku diiodometanu. Wartości swobodnej energii powierzchniowej w przypadku wszystkich badanych filmów wzrastają po napromienianiu (TABELA 2).

Składowa polarna (γ_s^p) swobodnej energii powierzchniowej również znacznie wzrasta po napromienianiu badanych próbek. Największe zmiany zachodzą w filmach chitozanu z 0,1% dodatkiem glutathionu.

Materials and methods

Chitosan, glutathione and camphorquinone were supplied by the company of Sigma-Aldrich. Phenylalanine were obtained from Fluka. The powder of chitosan was dissolved in 0.1 M acetic acid and chitosan solution was obtained with concentration of 0.5 weight %. Chitosan/glutathione, chitosan/phenylalanine and chitosan/camphorquinone blends were prepared by dissolving of suitable amount of glutathione, phenylalanine and camphorquinone in chitosan solution and the final weight ratio of chitosan-second component of blend was 99.9:0.1. Polymer films were prepared by solution casting onto glass plates. After solvent evaporation, the samples were dried in vacuum at room temperature.

Air-dried chitosan films and chitosan films containing additives were submitted to treatment with solar irradiation for 480 h, at a temperature 35°C, using a Suntest XLS lamp (Atlas), which emits light in the range 300-800 nm wavelength.

The surface properties of chitosan films and chitosan films containing additives before and after solar irradiation were investigated by contact angle measurements, which allow to calculate the surface free energy. The contact angles of two liquids: diiodometan and glycerol on the surface of studied films were measured using a goniometer equipped with the system of drop-shape analysis (G 10/DSA, Krüss, Germany). Each contact angle is the average value of maximum 10 measurements. The surface free energy (γ_s) and their dispersive (γ_s^d) and polar (γ_s^p) components were calculated by Owens-Wendt method.

Surface morphology of chitosan films and chitosan films containing additives were investigated using the technique of Atomic Force Microscopy (AFM). AFM was performed by using a MultiMode Scanning Probe Microscope Nanoscope IIIa (Digital Instruments Veeco Metrology Group, Santa Barbara, CA) operating in the tapping mode in air.

Results and discussion

The results of contact angle of two liquids with different polarity, namely diiodomethane and glycerol, are listed in TABLE 1.

The contact angle measured for chitosan films containing additives gave the results very similar to those obtained for pure chitosan films with all the liquids used. After irradiation we observed drop of contact angle for glycerol and only small

drop for diiodomethane. The surface free energy of chitosan films containing 0.1% of glutathione, camphorquinone and phenylalanine increases after irradiation time (TABLE 2). The polar component of surface free energy (γ_s^p) also reveals much higher value after irradiation.

The alterations of these parameters are the biggest in a case of chitosan with 0.1% of glutathione. The increase of polarity of the films indicates that photooxidation

TAB.1. Kąt zwilżania [°] zmierzony przy użyciu cieczy niepolarniej (diiodometanu) i cieczy polarnej (gliceryny) przed i po napromienianiu przez 480 h filmów chitozanowych oraz mieszanin: chitozan/glutathion, chitozan/kamforochinon i chitozan/fenyloalanina (99,9:0,01)
TAB.1. The contact angles [°] of different liquids (diiodomethane, glycerol) for chitosan and chitosan/glutathione, chitosan/camphorquinone and chitosan/phenylalanine blends before and after 480 h exposure to solar radiation (w/w 99.9:0.01)

Ciecz Liquid used	Kąt zwilżania [°] Contact angle [°]							
	Chitozan Chitosan		Chitozan/ Glutathion Chitosan/ Glutathione		Chitoza/ Kamforochinon Chitosan/ Camphorquinone		Chitozan/ Fenyloalanina Chitosan/ Phenylalanine	
	0h	480h	0h	480h	0h	480h	0h	480h
Diiodomethane	60.4	51.6	64.6	54.0	59.2	53.7	64.6	71.4
Gliceryna Glycerol	90.2	57.6	90.7	57.3	85.8	57.1	89.7	58.5

TAB.2. Swobodna energia powierzchniowa oraz składowa dyspersyjna (γ_s^p) i polarna (γ_s^d) swobodnej energii powierzchniowej przed i po napromienianiu przez 480h filmów chitozanowych oraz mieszanin: chitozan/glutation, chitozan/kamforochinon i chitozan/feniloalanina (99,9:0,01)

TAB.2. The surface free energy and the polar (γ_s^p) and dispersive (γ_s^d) component of surface free energy for chitosan, chitosan/glutathione, chitosan/phenylalanine and chitosan/camphorquinone blends before and after 480 h exposure to solar radiation (w/w 99.9:0.01)

	Czas naświetlania Irradiation time [h]	Swobodna energia powierzchniowa Surface free energy [mN/m]	Składowa dyspersyjna (γ_s^d) i polarna (γ_s^p) swobodnej energii powierzchniowej Polar (γ_s^p) and dispersive (γ_s^d) component of surface free energy [mN/m]	
			γ_s^d	γ_s^p
Chitozan	0	28,36	27,83	0,53
	480	40,90	27,71	13,19
Chitozan/ Glutation	0	25,94	25,11	0,83
	480	65,99	21,65	44,33
Chitozan/ Kamforochinon	0	29,12	27,81	1,30
	480	40,69	26,36	14,33
Chitozan/ Feniloalanina	0	25,98	24,93	1,04
	480	37,79	16,05	21,74

Zmiany te wskazują na fotoutlenianie powierzchni badanych filmów.

W TABELI 3 przedstawiono wyniki pomiarów chropowatości powierzchni badanych filmów uzyskane z analizy próbek metodą AFM.

Wnioski

W wyniku działania promieniowania słonecznego obserwuje się wzrost polarności próbek, co wskazuje na skuteczne procesy fotoutleniania na powierzchni badanych filmów. Wolne rodniki utworzone podczas napromieniania mogą reagować z tlenem atmosferycznym, prowadząc do utworzenia różnych grup zawierających tlen m.in. OH, OOH, CO. Najbardziej polarna po naświetlaniu stała się powierzchnia filmów chitozanowych zawierających glutation i feniloalaninę.

Wartość parametru chropowatości zmniejsza się po napromienianiu filmów chitozanowych z dodatkiem glutationu, kamforochinonu oraz feniloalaniny.

TAB.3. Średnie odchylenie kwadratowe chropowatości powierzchni filmów chitozanowych oraz mieszanin: chitozan/glutation, chitozan/kamforochinon i chitozan/feniloalanina (99,9:0,01)

TAB.3. RMS (root-mean-square roughness) for chitosan, chitosan/glutathione, chitosan/phenylalanine and chitosan/camphorquinone blends before and after 480 h exposure to solar radiation

	Czas naświetlania Irradiation time [h]	Chropowatość RMS roughness [mm]
Chitozan	0	28,36
	480	40,90
Chitozan/ Glutation	0	25,94
	480	65,99
Chitozan/ Kamforochinon	0	29,12
	480	40,69
Chitozan/ Feniloalanina	0	25,98
	480	37,79

reactions take place on their surface.

Surface roughness is one of the most important topographical parameters influencing cell-material interaction that can be available from the analysis of the information obtained from AFM (TABLE 3).

Conclusions

The increase of polarity of chitosan films indicates an efficient photooxidation on the surface upon solar radiation. Photooxidation of the surface of the above films leads to formation of oxidized groups such as OH, OOH, CO. The values of polar and dispersive components of surface free energy showed that chitosan films containing glutathione and phenylalanine were more polar than pure chitosan films.

Solar radiation causes the increase of surface roughness in case of pure chitosan, but when chitosan contains 0.1% glutathione, 0.1% camphorquinone or 0.1% phenylalanine we observed the decrease of surface roughness of studied films.

Piśmiennictwo

- [1]. R. Jayakumar, M. Prabaharan, S.V. Nair, H. Tamura. Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. *Biotechnology Advances*, (2010) 28: 142-150
- [2]. N.V. Majeti, R. Kumar. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers* (2000) 46: 1-27

References

- [3]. H. G. Chen, ; C.-S. Liu, ; C.-G. Liu, ; X.-H. Meng, ; H.-M. Lee,.; H.-J. Park, Preparation and biocompatibility of chitosan microcarriers as biomaterial. *Biochemical Engineering Journal*. (2006) 27: 269-274
- [4]. A. Sionkowska, Effects of solar radiation on collagen and chitosan films. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. (2006) 82: 9-15

CHARAKTERYSTYKA PROWADNIKÓW STOSOWANYCH W IMPLANTOWANIU KARDIOSTYMULATORÓW SERCA

JOANNA PRZONDZIO^{1*}, RAFAŁ MŁYNARSKI², JANUSZ SZALA¹,
ANNA KUR¹

¹POLITECHNIKA ŚLĄSKA W KATOWICACH,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIALOWEJ I METALURGII,
UL. KRASIŃSKIEGO 8, 40-019 KATOWICE, POLSKA

²ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY, UL. ZIOŁOWA 45/47, 40-635
KATOWICE

*MAILTO:JOANNA.PRZONDZIO@POLSL.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 56-58]

Wprowadzenie

Od ponad 50 lat w leczeniu bradyarytmii stosuje się stymulację serca. Pierwszy wewnętrzny rozrusznik wszczepił 8 października 1958 roku szwedzki kardiochirurg Ake Senning, przy współpracy z Rune Elmqvistem, który był jego producentem. Elektrody urządzenia były umieszczone na nasierdziu (tak zwane elektrody nasierdziowe), a nie wewnątrz jam serca. Niestety, rozrusznik zawiódł już po 3 godzinach. Jednak od tego przełomowego momentu obserwuje się dynamiczny rozwój elektroterapii, której skuteczności dowiodła zarówno praktyka kliniczna, jak i wyniki badań naukowych [1-3].

Dzięki postępowi w dziedzinie mikroelektroniki stosowane obecnie urządzenia są mniejsze, cechują się większymi możliwościami programowania, zaś elektrody stymulatorów stały się cieńsze, jednocześnie charakteryzując się wyższą trwałością. Celem udoskonalenia i modyfikacji – zarówno sprzętowych, jak i programowych – jest zapewnienie odpowiedniej elektrycznej stabilizacji rytmu serca i korekty zaburzeń przewodzenia w sposób umożliwiający uzyskanie czynności elektrycznej serca możliwie najbardziej zbliżonej do stanu prawidłowego. Producenci i lekarze dążą również do wydłużenia czasu funkcjonowania urządzeń oraz eliminacji powikłań leczenia stymulacją [3].

Elektroterapia obejmuje wszczepianie wielu urządzeń, z których najważniejsze to [4]:

- kardiostymulatory zwane potocznie rozrusznikami serca,
- kardiowertery-defibrylatory (ICD, Implanted Cardioverter Defibrillator),
- układy CRT (Cardiac Resynchronisation Therapy) do stymulacji dwukomorowej biwentrikularnej,
- układy CRT-ICD do stymulacji dwukomorowej z funkcją kardiowertera-defibrylatora.

Powodzenie zabiegów elektroterapii zależy od szeregu czynników, a jednym z nich jest właściwy dobór instrumentarium i materiałów pomocniczych. Istotne znaczenie w prawidłowej realizacji implantowania kardiostymulatora mają przewodniki, których zadaniem jest wprowadzenie elektrod endokawitarnych.

W pracy przedstawiono charakterystykę przewodników stosowanych podczas wszczepiania kardiostymulatora. Pomiarów dokonano metodami

CHARACTERISTICS OF LEADERS USED IN HEART PACEMAKERS IMPLANTATION

JOANNA PRZONDZIO^{1*}, RAFAŁ MŁYNARSKI², JANUSZ SZALA¹,
ANNA KUR¹

¹SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS ENGINEERING AND METALLURGY,
8 KRASIŃSKIEGO STREET, 40-019 KATOWICE, POLAND

²MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, DEPARTMENT OF CARDIOLOGY,
45/47 ZIOŁOWA STREET, 40-635 KATOWICE, POLAND

MAILTO:JOANNA.PRZONDZIO@POLSL.PL

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 56-58]

Introduction

For over 50 years of curing bradyarrhythmia, heart stimulation has been used. The first internal pacemaker was implanted on 8. October, 1958 by a Swedish heart surgeon Ake Senning, in cooperation with Rune Elmqvist who was its producer. Electrodes of the device were placed on epicardium (so called epicardial electrodes), not inside heart cavities. Unfortunately, the pacemaker failed after only 3 hours. However, since that critical moment, we can witness a rapid development of electrotherapy, the effectiveness of which has been proved by both: clinical practice as well as the results of scientific research. [1-3].

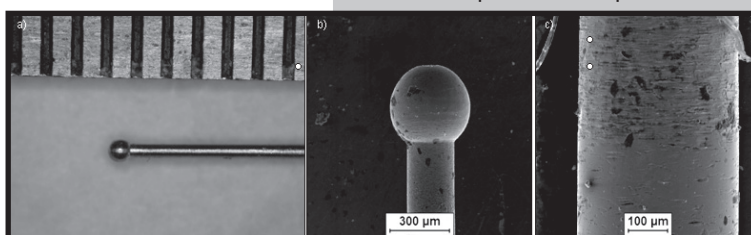
Thanks to development in the field of microelectronics, the devices used nowadays are smaller, they feature better software capabilities, and electrodes of stimulators are thinner and at the same time more durable. The aim of improvements and modifications, related to hardware as well as software – is to provide suitable electrical stabilisation of heart rate and correction of conduction disorders in a way that enables to obtain such electrical activity of heart that is as close to the correct state as possible. Manufacturers and doctors also aim at prolongation of functional time of devices and removal of complications arising during treatment by stimulation [3].

Electrotherapy includes implantation of various devices, among which the most important ones are [4]:

- cardiac pacemakers,
- ICD - Implanted Cardioverter Defibrillators,
- CRT devices - Cardiac Resynchronisation Therapy – for cardiac resynchronisation therapy,
- CRT-ICD devices for biventricular stimulation with ICD functions.

The success of electrotherapy treatment depends on a variety of factors. One of them is proper selection of equipment and accessories. Leaders, the purpose of which is to lead endocavitary electrode, are of great importance for correct implantation of pacemaker.

The study presents characteristics of leaders used for implantation of pacemakers. Measurements were made by means of computer-aided quantitative metallography. By means of electron scanning microscope



RYS.1. Prowadnik prosty
FIG.1. Straight leader

metalografii ilościowej wspomaganej komputerowo. Przy pomocy elektronowego mikroskopu skaningowego z emisją polową FE SEM S-4200 HITACHI współpracującego ze spektrometrem Voyager 3500 Noran Instruments przeprowadzono jakościową i ilościową analizę składu chemicznego. Ustalono właściwości mechaniczne przewodników.

Badania przewodników

Stosowane komercyjnie w elektroterapii przewodniki mają postać drutów. Badaniom poddano przewodnik prosty średnicy 0,4 mm i długości 680 mm oraz przewodnik, którego końcówka jest ukształtowana w kształcie litery „J”. Średnica przewodnika zakrzywionego wynosi 0,35 mm, a jego długość 550 mm. Przewodnik prosty służy do wprowadzania elektrody komorowej, natomiast przewodnik zakrzywiony przeznaczony jest do wprowadzania elektrody przedsionkowej.

Przewodnik prosty charakteryzuje się specjalnym zakończeniem o długości 35 mm, którego średnica ulega stopniowej redukcji. Na końcu przewodnika znajduje się kulka (RYS.1a – zdjęcie wykonano na mikroskopie stereoskopowym firmy Olympus SZX9). Na RYS.1b i c pokazano kulkę oraz strefę przejściową między drutem prostym średnicy 0,4 mm a końcówką o zmniejszającej się średnicy. Do zmniejszania średnicy końcówki przewodnika zastosowano zabieg szlifowania.

Badania zrealizowane na mikroskopie skaningowym wskazują, że wszystkie części przewodnika prostego zostały wyprodukowane ze stali nierdzewnej o zawartości ~20% Cr i 10% Ni (RYS.2).

Przewodnik zakrzywiony (RYS.3) również charakteryzuje się zakończeniem, którego średnica ulega stopniowemu zmniejszaniu. Na końcu przewodnika znajduje się kulka (RYS.3a,b). Kończówkę przewodnika szlifowano celem stopniowej redukcji średnicy (RYS.3c).

Analiza zrealizowana na mikroskopie skaningowym wykazała, że przewodnik zakrzywiony wyprodukowany został również ze stali nierdzewnej chromowo-niklowej.

Badania właściwości mechanicznych wykonane na maszynie wytrzymałościowej firmy Instron wykazały, że drut średnicy 0,4 mm, którego użyto do produkcji przewodnika prostego charakteryzuje się: wytrzymałością na rozciąganie $R_m=1950$ MPa oraz wydłużeniem względnym $A_{100}=2,5\%$. Właściwości mechaniczne drutu średnicy 0,35 mm zastosowanego do wytworzenia przewodnika zakrzywionego są następujące: wytrzymałość na rozciąganie $R_m=1970$ MPa oraz wydłużenie względne $A_{100}=2,8\%$.

Podsumowanie

Implantacja rozruszników serca jest zabiegiem stosowanym powszechnie u coraz większej liczby pacjentów. Rozrusznik jest urządzeniem służącym do elektrycznego pobudzania rytmu serca. Stosuje się go, gdy węzeł zatokowy w wyniku różnych schorzeń przestaje spełniać swoją rolę, co prowadzi do bradykardii, a w konsekwencji może prowa-

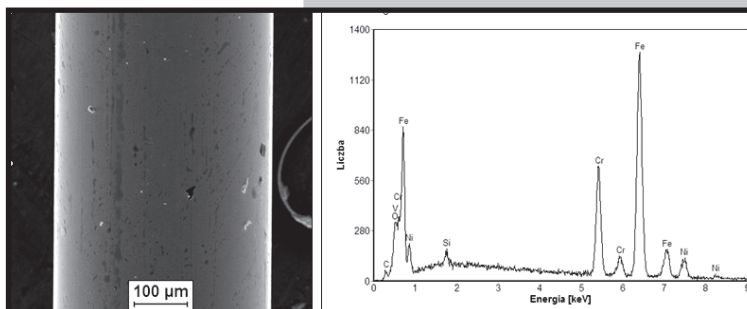
with field emission FE SEM S-4200 HITACHI in cooperation with spectrometer Voyager 3500 Noran Instruments, qualitative and quantitative analysis of chemical composition was made. Mechanical characteristics of leaders was determined.

Tests of leaders

Leaders used commercially in electrotherapy have the shape of wire. The tests involved straight leader with diameter of 0,4 mm and length of 680 mm and leader with “J” shaped end. Diameter of curved leader was 0,35 mm, and its length was 550 mm. Straight leader is used for inserting

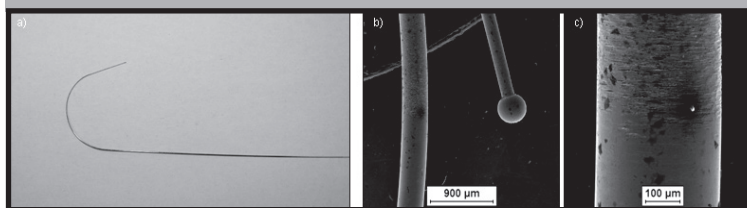
ventricular lead, whereas curved leader is used for inserting atrial lead.

Straight leader features special end, 35 mm long, whose diameter is gradually reduced. At the end of the leader there is a ball (FIG.1a – the picture was taken by means of stereoscopic microscope by Olympus SZX9). Fig.1b and c show the ball and the transitional zone between straight wire with diameter of 0,4 mm and the end with decreasing diameter. Grinding enabled to decrease the diameter of leader



RYS.2. Drut średnicy 0,3 mm i zarejestrowane widmo promieniowania rentgenowskiego

FIG.2. Wire with diameter of 0,3 mm and registered X-radiation spectrum



RYS.3. Przewodnik z końcówką wyprofilowaną w kształcie litery „J”

FIG.3. Leader with J-shaped end

end.

Tests carried out by means of scanning microscope show that all parts of straight leader were made of stainless steel with contents of Cr ~20% and content of Ni 10% (FIG.2).

Curved leader (FIG.3) also features the end whose diameter is gradually decreased. There is a ball at the end of the leader (FIG.3a,b). The end of the leader was ground in order to reduce its diameter gradually (FIG.3c).

Analysis realised by means of scanning microscope showed that curved leader was also made of chromium and nickel stainless steel.

Tests of mechanical properties, made on Instron testing machine, showed that wire with diameter of 0,4 mm, which straight leader was made of, features: tensile strength $R_m=1950$ MPa and relative elongation $A_{100}=2,5\%$. Mechanical properties of wire with diameter of 0,35 mm used for production of curved leader are as follows: tensile strength $R_m=1970$ MPa and relative elongation $A_{100}=2,8\%$.

Summary

Implantation of pacemakers is a widely used treatment for an increasing number of patients. Pacemaker is a device that is used for electrical activation of heart rate. It is used when, due to various diseases, sinusatrial node fails to perform its function, which leads to bradycardia and in the

dział do objawów niedokrwienia mózgu lub niewydolności serca. Innym powodem implantacji są również zaburzenia przewodzenia przedsionkowo-komorowego (tzw. bloki serca). W Polsce żyje ponad 100 000 osób z wszczepionym kardiostymulatorem, a liczbę wszczepień szacuje się na 9500-rocznie. 80-90% tych zabiegów to wszczepienia nowych rozruszników (implantacja kardiostymulatora), a w 10-20% to wymiany wyczerpanych stymulatorów (re-implantacja). Bardzo wysoka cena importowanych urządzeń do stymulacji (w tym również przewodników) powoduje, że nie wszyscy chorzy mogą liczyć na implantację. Niniejsza praca sygnalizuje konieczność podjęcia badań dotyczących technologii produkcji przewodników.

Opracowanie i wdrożenie technologii wytwarzania przewodników przeznaczonych do wprowadzania elektrod pozwoliłoby na wyeliminowanie importu tych materiałów, a tym samym na zaopatrzenie krajowych ośrodków kardiologicznych w wyrób spełniający wymogi nowoczesnej elektroterapii.

long run it can cause the symptoms of cerebral ischaemia or cardiac failure. Another reason for implantation is also disorders of rhythm and atrio-ventricular conduction (so called heart blocks). In Poland there are over 100 000 people with implanted pacemaker and the number of implantations is estimated at 9500 per year. 80-90% of those interventions are implantations of new pacemakers (pacemaker implantation), and 10-20% are replacements of worn stimulators (re-implantation). Extremely high price of imported devices for stimulation (including leads) is the reason why implantation cannot be performed on everybody who is ill. This study points out that tests related to technology of leads' manufacturing are necessary.

Elaboration and implementation of technology used for manufacturing leads used for electrode insertion would enable to give up importing those materials, and at the same time to supply domestic cardiac centres with product that meets the requirements of modern electrotherapy.

Piśmiennictwo

- [1]. Luderitz B.: We have come a long way with device therapy: historical perspectives on antiarrhythmic electrotherapy. J Cardiovasc Electrophysiol 2002;13(Suppl. 1): 2-8.
[2]. Elmquist R, Senning A.: Implantable pacemaker for the heart. In: Smyth CN, ed. Medical Electronics. Proceedings of the Second International Conference on Medical Electronics, Paris, 24-27 June 1959. London, UK: Iliffe & Sons; 1960. 253-254. (Abstract).

References

- [3]. Grupa Robocza Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego ds. stymulacji serca i resynchronizacji we współpracy z Europejskim Towarzystwem Rytmu Serca: Wytyczne dotyczące stymulacji serca i resynchronizacji. <http://www.kardiologiapolska.pl/>; 02.07.2010.
[4]. Kargul W., Młynarski R., Piłat E.: Implantowanie stymulatorów serca i kardiowerterów-defibrylatorów. Chirurgia Polska 2005, 7, 4, 267-279.

DEGRADACJA IMPLANTÓW METALICZNYCH POKRYTYCH SREBREM

BEATA ŚWIECZKO-ŻUREK^{1*}, ANNA PAŁUBICKA²,
MICHAŁ BOGDAŃSKI², MAREK KRZEMIŃSKI²

¹POLITECHNIKA GDAŃSKA,
WYDZIAŁ MECHANICZNY, KATEDRA INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ
UL.G.NARUTOWICZA 11/12, 80-952 GDAŃSK,

²SZPITAL W KOŚCIERZYNIE

*MAILTO: BSWIECZKO@MECH.PG.GDA.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 58-60]

Wstęp

Srebro ze swych antybakteryjnych właściwości znane było już w starożytności. Antyczni Grecy, aby zapobiec szerzeniu się chorób pokrywali talerze i kubki srebrem, wrzucali srebrne monety do kan z wodą, aby przedłużyć czas jej przydatności do spożycia, podawali również dzieciom srebrne łyżeczki do ssania, co miało chronić je przed chorobami. W latach 90 XX w. naukowcy zauważyli, że osoby, u których występuje niski poziom srebra jako pierwiastka śladowego, często chorują na choroby o etiologii wirusowej, bakteryjnej oraz grzybiczej. Jednak nadmiar srebra wprowadzony do organizmu może prowadzić do nekrozy tkanek wątroby, a zwiększona jego zawartość w pożywieniu powoduje u człowieka przebarwienia skóry i błon śluzowych w postaci niebieskoszarych plam [1].

Bosetti i wsp. [2] w swoich badaniach dowodzą braku toksycznego wpływu srebra na komórki ludzkie (tj. limfocyty,

DEGRADATION OF METAL IMPLANTS COVERED WITH SILVER

BEATA ŚWIECZKO-ŻUREK^{1*}, ANNA PAŁUBICKA²,
MICHAŁ BOGDAŃSKI², MAREK KRZEMIŃSKI²

¹TECHNICAL UNIVERSITY OF GDANSK,
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING,
11/12 NARUTOWICZA STREET, 80-952 GDAŃSK,

²HOSPITAL IN KOŚCIERZYNIA

*MAILTO: BSWIECZKO@MECH.PG.GDA.PL

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 58-60]

Introduction

Silver was known for its antibacterial properties as long ago as in antiquity. The Greeks covered their plates and mugs with silver to prevent spread of diseases, they also put silver coins into jugs of water to prolong the duration of the liquid. Greek children were given silver spoons to suck to prevent them from getting ill. In the 90 of the 20th century scientists discovered that people with insufficient amount of silver in their bodies are frequently subjected to virus, bacteria and other illnesses. However too much silver introduced into the body may result in necrosis of the liver tissues. Too big amount of silver contained in food may cause blue-grey spots on the skin [1].

Bosetti and others [2] proved lack of toxic influence of silver on human cells (limphocytes, fibroblasts and osteoblasts). They also claim that silver increases activity of bone cells to develop (osteoblasts). This argument arose interest

fibroblasty i osteoblasty), a nawet twierdzą, że metal ten pobudza komórki kościotwórcze (osteoblasty) do wzmożonej aktywności. Argument ów dodatkowo budzi zainteresowanie srebrem jako czynnikiem nadającym się do użytku medycznego [2].

Jony srebra mają zdolność wiązania się ze ścianą komórkową bakterii, cytoplazmą czy też otoczką. Niskie stężenia jonów Ag^+ indukują zwiększony wpływ protonów poprzez błonę cytoplazmatyczną bakterii, prowadząc do całkowitej dezorganizacji tej struktury i ostatecznie do śmierci komórki. Aktywność przeciwbakteryjna jonów srebra jest wprost proporcjonalna do stężeń jonów Ag^+ w środowisku [3].

Materiał i metodyka badań

Przedmiotem badań było 7 próbek wyciętych z implantu (RYS.1)

Materiałem badanym była stal austenityczna, co potwierdza przeprowadzona analiza składu chemicznego (RYS.2).

Na powierzchnię próbek naniesiono cienką warstwę srebra i zanurzono je w 7 różnych bulionach bakteryjnych (bakterie najczęściej spotykane w organizmie ludzkim): *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, MRSA, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus epidermidis*.

Po upływie miesiąca próbki zostały wyjęte z bulionu. W celu identyfikacji biofilmu za pomocą pipety na próbki naniesiono 1% TTC Solution (trifenylotetrazol chloru). Następnie wykonano zdjęcia mikroskopowe (elektronowy mikroskop skaningowy Philips XL 30) (RYS.3).

Dyskusja i wnioski

Zainteresowanie srebrem ze względu na jego antybakteryjne właściwości stale rośnie. Srebro to pierwiastek śladowy niezbędny do prawidłowego funkcjonowania ludzkiego organizmu. Niedobór jonów srebra w organizmie człowieka objawia się zwiększoną podatnością na infekcje, związaną z obniżoną odpornością immunologiczną [4].

Badania in vitro [2] dowodzą zwiększonej skuteczności implantów zawierających srebro, stosowanych przy złamaniach czy też stłuczeniach. Implanty zawierające srebro zapobiegają adhezji na obcych elementach wprowadzonych do makroorganizmu oraz pozytywnie wpływają na aktywność osteoblastów.

Obserwacja powierzchni próbek na elektronowym mikroskopie skaningowym wykazała kolonie bakterii, które osadziły się na materiale w formie biofilmu. Po jego usunięciu nie było żadnych oznak degradacji materiału. Obecnie przeprowadzane są dalsze badania na próbkach z czystego srebra.

in silver as an element suitable for medical use [2].

The silver ions have ability to join the bacteria surface. Low density of silver ions Ag^+ influence the protons through the bacteria surface, which results in total destruction of the cell. Antibacterial activity of silver remains in proportion with the density of silver ions Ag^+ in the environment [3].



RYS.1 Widok próbki wyciętej z implantu
FIG.1 The view of an implant sample

Element	Wt %	At %
SiK	0.58	1.16
CrK	17.57	19.09
MnK	1.93	1.99
FeK	59.97	60.68
NiK	14.29	13.75
MoK	5.66	3.34
Total	100.00	100.00

Element	Net Inte.	Bkgd Inte.	Inte. Error	P/B
SiK	2.34	4.71	14.66	0.50
CrK	151.88	6.61	0.85	22.98
MnK	13.25	5.77	3.76	2.30
FeK	358.53	5.32	0.54	67.39
NiK	58.28	4.06	1.40	14.35
MoK	2.07	1.38	10.62	1.50

RYS.2 Skład chemiczny badanego materiału
FIG.2 The chemical compounds of the examined material

The material and the research methods

Research was carried on 7 implant samples (FIG.1).

The examined material was stainless steel, which was confirmed by the analysis of chemical compounds (FIG.2).

A thin silver covering was placed on the surface of the samples. Then they were put into 7 different kinds of bacteria liquids (the bacteria most frequently appearing in human body): *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, MRSA, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus epidermidis*.

After a month the samples were taken out of the liquids. 1% TTC Solution was placed on the surface. After that the microscope photos were taken (scanning electron microscope Philips XL 30) (FIG.3).

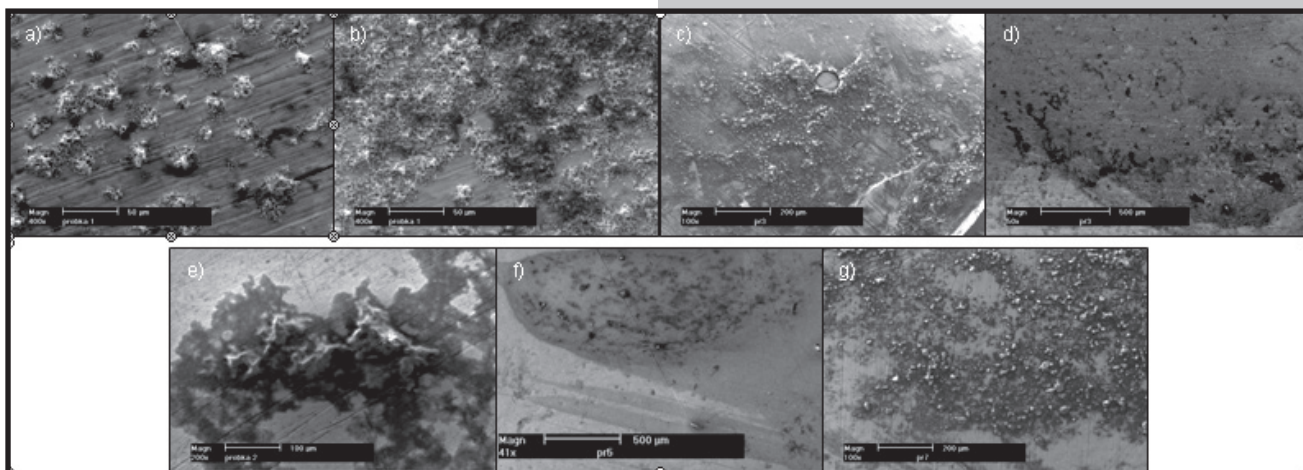
tron microscope Philips XL 30) (FIG.3).

The discussion and conclusions

Interest in antibacterial properties of silver is steadily increasing. Silver is an element indispensable for proper functioning of body. Lack of silver ions in human body makes it prone to infections caused by lower immunological resistance [4].

The in vivo research proves bigger effectiveness of implants containing silver and used in fractions and bruises. The implants containing silver prevent adhesion on implants and have positive influence on the activity of osteoblasts.

The observation of sample surfaces on the microscope showed the bacteria colonies, which covered the material in the form of biofilm. After removing it there were no signs of material degradation. Further research is performed on pure silver samples.



RYS.3 Widok próbek wyjętych z poszczególnych bulionów: a) *Enterococcus faecium*, b) *Eserichia coli*, c) *Pseudomonaes aueruginosa*, d) MRSA, e) *Enterobacter cloacae*, f) *Acinenterobacter baumani*, g) *Staphylococcus epidermidis*

FIG.3 The view of the samples taken out of the bacteria liquid: a) *Enterococcus faecium*, b) *Eserichia coli*, c) *Pseudomonaes aueruginosa*, d) MRSA, e) *Enterobacter cloacae*, f) *Acinenterobacter baumani*, g) *Staphylococcus epidermidis*

Podziękowania

Praca jest finansowana dzięki projektowi PORTAL (contract No. NCBiR/ERA-NET MATERIA/5/2009).

Acknowledgments

The research has been performed as a part of the PORTAL Project (contract No. NCBiR/ERA-NET MATERIA/5/2009).

Piśmiennictwo

- [1] Bugla-Płoskońska G., Oleszkiewicz A.: The biological activity of silver and its application in medicine. <http://ag123.pl/Biologiczna-aktywnosc-srebra-i-jego-zastosowanie-w-medycynie.html>
- [2] Bosetti M., Masse A., Tobin E., Cammas M.: Silver coated materials for external fixation devices, in vitro biocompatibility and genotoxicity. *Biomaterials* 23, 2002, p.887-892

References

- [3] Brinker C.J., Scherrer G.W., 1990, Sol-Gel Science. London. Academic Press INC. Chmielowski J., Kłapcińska B., 1984, The mechanisms of metal absorption by bacteria. *The microbiological progress* 23, p. 63-88
- [4] Hamilton-Miller J.M.T., Shah S.: A microbiological assesment of silver fusiolate, a novel topical antimicrobial agent. *Int. J. Antimicrob. Agents* 7, 1996, p. 97-99

ODTWARZANIE WZORÓW POLIMEROWYCH PRZEZ ADSORBUJĄCE BIAŁKA: ANALIZA PORÓWNAWCZA OBRAZÓW AFM I OBRAZÓW FLUORESCENCYJNYCH ZA POMOCĄ GEOMETRII CAŁKOWEJ

JOANNA ZEMLA^{1*}, MAŁGORZATA LEKKA², JOANNA RACZKOWSKA¹,
ANDRZEJ BERNASIK³, JAKUB RYSZ¹, ANDRZEJ BUDKOWSKI¹

¹INSTYTUT FIZYKI IM. M. SMOLUCHOWSKIEGO,
UNIwersytet Jagielloński,
REYMONTA 4, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

²INSTYTUT FIZYKI JADROWEJ IM. H. NIEWODNICZAŃSKIEGO,
POLSKA AKADEMIA NAUK,
RADZIKOWSKIEGO 152, 31-342 KRAKÓW, POLSKA

³WYDZIAŁ FIZYKI I INFORMATYKI STOSOWANEJ,
AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,
MICKIEWICZA 39, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

*MAILTO: JOANNA.ZEMLA@UJ.EDU.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 61-62]

Materiały polimerowe mają wiele zastosowań biomedycznych, wykonuje się z nich implanty medyczne, bio-sensory służące do diagnostyki, systemy kontrolowanego dozowania leków. W zależności od obszaru stosowania, specyficzna adsorpcja protein do biomateriałów jest zjawiskiem pożądanym (biosensory, dostarczanie leków) lub niepożądanym (implanty). Niestety oprócz oddziaływania w sposób specyficzny, większość białek wykazuje tendencję do fizycznej adsorpcji do powierzchni polimerowych co może powodować zmianę konformacji białka, co skutkuje utratą funkcji biologicznych. W przypadku wszczepionych biomateriałów, może pojawić się problem niespecyficznej adsorpcji białek, która prowadzi do enkapsulacji lub nawet do odrzucenia implantu. W rzeczywistości nie istnieje materiał, który w ogóle nie adsorbuje białek in vivo, jednak można stosować materiały, do których białka adsorbują w sposób kontrolowany, co pozwoli na zminimalizowanie ryzyka odrzutu. W związku z tymi problemami prowadzi się badania polimerów, mające na celu sprawdzenie stopnia adsorpcji różnych białek do tych polimerów. [1]

Wiedza o stopniu adsorpcji białek do powierzchni polimerowych może być wykorzystana do tworzenia mikro-macierzy białkowych, czyli macierzy dużej liczby białek rozmieszczonych przestrzennie na małej powierzchni. Morin et al. [2] pokazali, że istnieje możliwość selektywnej adsorpcji białek do domen fazowych wzorów polimerowych. Cienkie warstwy polimerowe są interesujące ze względu na ich zróżnicowane własności (hydrofobowość, ładunek).

Cienkie warstwy z binarnymi wzorami polimerowymi, uformowane na dużych obszarach przez pary polimerów: polistyren/ poli(metakrylan metylu) PS/ PMMA oraz polistyren/ poli(tlenek etylenu) PS/ PEO, zostały użyte do zbadania selektywnej adsorpcji dwóch białek (lektyn: concanavalin A oraz lentil lectin) i do zanalizowania jakości odtworzenia wzorów polimerowych przez zaadsorbowane białka. [1] Wzory polimerowe powstały w procesie samoorganizacji (spontaniczna separacja fazowa) oraz przez zastosowanie jednej z technik miękkiej litografii – mikroformowania warstw (SAMIM). (RYSUNEK 1)

POLYMER PATTERNS REPLICATED BY ADSORBING PROTEINS: COMPARISON OF AFM AND FLUORESCENCE IMAGES WITH INTEGRAL GEOMETRY ANALYSIS

JOANNA ZEMLA¹, MAŁGORZATA LEKKA², JOANNA RACZKOWSKA¹,
ANDRZEJ BERNASIK³, JAKUB RYSZ¹, ANDRZEJ BUDKOWSKI¹

¹SMOLUCHOWSKI INSTITUTE OF PHYSICS,
JAGIELLONIAN UNIVERSITY,
4 REYMONTA STREET, 30-059 CRACOW, POLAND

²THE HENRYK NIEWODNICZASKI INSTITUTE OF NUCLEAR PHYSICS,
POLISH ACADEMY OF SCIENCES,
152 RADZIKOWSKIEGO STREET, 31-342 CRACOW, POLAND

³FACULTY OF PHYSICS AND APPLIED COMPUTER SCIENCE,
AGH-UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
39 MICKIEWICZA AVENUE, 30-059 CRACOW, POLAND

*MAILTO: JOANNA.ZEMLA@UJ.EDU.PL

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 61-62]

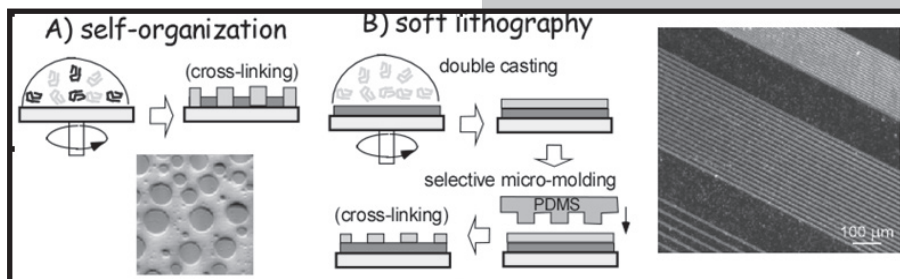
Polymer-based bio-materials are commonly used in biomedical applications such as medical implants, bio-sensors for biomedical diagnostics, controlled drug-delivery systems, and templates for tissue engineering due to their varied properties. The knowledge of how to control the protein adsorption is essential for all applications, such as bio-sensors or drug delivery, where the immobilization of proteins is desired. Unfortunately, apart from the specific interactions, most of the proteins reveal an additional tendency to adsorb physically onto polymeric substrates, thereby reducing their functionality. On the other hand, studies on protein adsorption are also crucial in designing bio-compatible surfaces where the elimination or reduction of the protein adsorption improves their performance. The main problem when a bio-material is introduced into the human body is nonspecific protein adsorption to the material, which can initiate a cascade of events that eventually can result in encapsulation, or even rejection, of the material from the body. It is impossible to create a surface that will completely prevent protein adsorption in vivo. Instead, by controlling and modulating protein adsorption to surfaces, it is likely to produce devices that can interact with biological systems without adverse effects [1].

The knowledge of how proteins interact with polymer surfaces can be used to create protein micro-arrays, that is, arrays of large number of proteins distributed spatially in a very small space. An additional possibility of selective protein adsorption to the domains of phase-separated polymer blends was shown by Morin et al.[2]. Polymer blend films are attractive as their surface properties (e.g., hydrophobicity, charge) are varied at length scales comparable to both single molecules (tens of nanometers) and whole cells (tens of micrometers).

Thin films with binary polymer surface patterns, formed over large areas by the pairs: polystyrene/ poly(methyl methacrylate) PS/ PMMA and polystyrene/ poly(ethylene oxide) PS/ PEO, are used as substrates to study selective adsorption of two proteins (lectins: concanavalin A and lentil lectin) and to test reconstruction of polymer patterns by these proteins [1]. The polymer patterns are formed by self-organization (spontaneous phase-separation) during blend

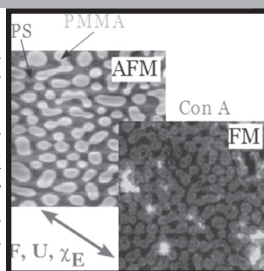
Analiza geometrii całkowitej [3] została użyta do ilościowego porównania obrazów fluorescencyjnych domen białek [4] z obrazami AFM oryginalnych wzorów polimerowych [5] (RYSUNEK 2). Wyniki dalekozasięgowej analizy całkowitej są przedstawione w postaci średnich wartości miar morfologicznych opisujących stopień pokrycia F , długość powierzchni międzyfazowej U oraz współczynnik Eulera χ_E obliczonych dla obrazów domen białkowych i wzorów polimerowych. Wartości współczynników Minkowskiego są porównywane w celu

oceny jakości odtworzenia oryginalnego wzoru oraz do porównania różnych wzorów powierzchniowych. Stwierdzono selektywną adsorpcję obu lektyn do domen PMMA, wzmocnioną w obszarze granicy faz. Natomiast dla podłoża PS/ PEO stwierdzono wysoce selektywną adsorpcję białek do domen PS.



RYSUNEK 1. Wzory polimerowe wytworzone przez samoorganizację (A) i miękką litografię (B).

FIGURE 1. Polymer patterns formed by self organization (A) and soft lithography (B).



RYS.2. Obraz AFM wzoru polimerowego PS/ PMMA oraz obraz fluorescencyjny tej powierzchni po zaadsorbowaniu białek (ConA).

FIG.2. AFM image of PS/ PMMA film and fluorescence micrograph of the pattern with adsorbed proteins (ConA).

simply compared to collate different surface patterns and to examine pattern replication. Preferential adsorption of both lectins to PMMA domains, enhanced for PS/ PMMA interfaces is concluded. In turn, protein binding to PS phase regions of PS/PEO blends is highly selective.

casting and by a soft lithographic method of solvent-assisted micro-molding (SAMIM). (FIGURE 1)

Integral geometry approach [3] is used to compare quantitatively fluorescence micro-graphs of protein patches [4] with AFM images of original polymer patterns [5] (FIGURE 2). Results of non-

local geometry analysis are expressed in terms of average morphological measures describing area fraction F , perimeter U , and connectivity χ_E of both protein patches and polymer patterns. The morphological measures are

Piśmiennictwo

- [1] Zemła, J.; Lekka M.; Raczkowska J.; Bernasik A.; Rysz J.; Budkowski A. *Biomacromolecules* 2009, 10, 2101-2109.
- [2] Morin, C.; Hitchcock, A. P.; Cornelius, R. M.; Brash, J. L.; Urquhart, S. G.; Scholl, A.; Doran, A. J. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* 2004, 137-140, 785-794.
- [3] Mecke, K. R. *Phys. Rev. E* 1996, 53, 4794-4800.

References

- [4] Zemła, J.; Lekka M.; Wiltowska-Zuber J.; Budkowski A.; Rysz J.; Raczkowska J. *Langmuir* 2008, 24, 10253-10258.
- [5] Raczkowska, J.; Rysz, J.; Budkowski, A.; Lekki, J.; Lekka, M.; Bernasik, A.; Kowalski, K.; Czuba, P. *Macromolecules* 2003, 36, 2419-2427.

WPLYW ŚRODOWISKA BAKTERYJNEGO NA POWSTAWANIE BIOFILMU NA STOPIE TYTANU – Ti-13Nb-13Zr

JOANNA ZORN^{1*}, ANNA PAŁUBICKA²

¹POLITECHNIKA GDAŃSKA, WYDZIAŁ MECHANICZNY

²SZPITAL W KOŚCIERZYŃNIE

*MAILTO: ASIA.ZORN@GMAIL.COM

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 63]

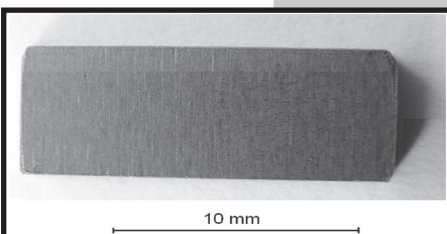
Zakażenia bakteryjne są jednymi z najczęściej spotykanych komplikacji po zabiegach ortopedycznych [1]. Gdy pacjent nie otrzyma odpowiednio szybko pomocy ze strony lekarzy może dojść do licznych powikłań, nawet takich, które zagrażają życiu. Obecność biofilmu jest wyjątkowo korzystna dla rozwoju mikroorganizmów, a to może doprowadzić do zaniku otaczającej tkanki kostnej i w rezultacie zaburzyć proces osteointegracji [2]. Dlatego przeprowadzono badania w środowisku 7 bakterii (*Pseudomonas*, *Klebsiella oxytoca*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus aureus* – MRSA i MSSA, *Enterococcus spp.*) w celu określenia korelacji między materiałem podłoża (stopem tytanu Ti-13Nb-13Zr) a środowiskiem w jakim się on znajduje, na tworzenie się biofilmu.

Próbki o wymiarach 5x15 mm zostały wycięte z blachy o grubości 3mm i przygotowane przez Warsztat Centralny Politechniki Gdańskiej, zostały one podzielone na dwie grupy (RYS. 1). Jedną grupę stanowiły próbki odtłuszczone, a drugą odtłuszczone i wyjalowione.

Kolejnym krokiem było przygotowanie próbek z pożywką (TSA – tryptic soy agar) i szczepem bakterii. Następnie do próbek wprowadzono po 2 próbki i całość odstawiono do cieplarki o temperaturze 36°C (±0,5°C) na okres 30dni. Po upływie tego czasu z każdej próbki zostanie wyciągnięta jedna próbka w celu identyfikacji biofilmu za pomocą TTC Solution 1%. Po 60 dniach czynność ta zostanie powtórzona.

Dodatkowo przeprowadzono takie same badania na stopie Ti-6Al-4V, aby stwierdzić czy skład chemiczny może mieć wpływ na wyżej określoną zależność (TABELA 1). Doświadczenia zostały przeprowadzone w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej i Mikrobiologii w Szpitalu w Kościerzynie.

Uzyskane wyniki zostaną zaprezentowane na konferencji w Rytrze pt. „Biomateriały w medycynie i weterynarii”.



RYS.1. Próbkę do badań w środowisku bakteryjnym o wymiarach 5x15mm

FIG.1. A sample for testing in a bacterial environment size 5x15mm

TABLE 1. Skład chemiczny stopów tytanu: Ti-13Nb-13Zr i Ti-6Al-4V (%wag.) [3].
TABLE 1. Chemical composition (wt.%) of Ti-13Nb-13Zr, Ti-6Al-4V alloys [3].

Stop tytanu Titanium alloy	Skład chemiczny Chemical components [%]											
	C	H	N	O	Fe	Al	S	Hf	V	Nb	Zr	Ti
Ti-13Nb-13Zr	0,035	0,010	0,004	0,078	0,085	-	<0,001	0,055	-	13,179	13,489	Bal.
Ti-6Al-4V	0,024	0,005	0,006	0,18	0,17	6,0	-	-	4,1	-	-	Bal.

Piśmiennictwo

- [1]. Potat K., Eltgroth M., La Tempa T., Grimes C., Desai T.: Decreased *Staphylococcus epidermis* adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes., *Biomaterials* 28 (2007), s. 4880-4888
- [2]. Świeczko-Żurek B.: Tworzenie biofilmu na biomateriałach metalicznych. Materiały pomocnicze, Politechnika Gdańska, Gdańsk 2009

THE IMPACT OF BACTERIAL ENVIRONMENT ON FORMATION OF BIOFILM ON THE TITANIUM ALLOY – Ti-13Nb-13Zr

JOANNA ZORN^{1*}, ANNA PAŁUBICKA²

¹GDASK UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

²HOSPITAL IN KOŚCIERZYŃA

*MAILTO: ASIA.ZORN@GMAIL.COM

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 63]

Bacterial infection is the most common complication which may occur an orthopedic surgery [1]. If the patient does not receive help from the doctors on time, they can suffer a lot of serious complications, even those life-threatening. The presence of biofilm is extremely beneficial for the growth of micro-organisms and this may lead to loss of surrounding bone tissue and consequently disrupt the process of osseointegration [2]. Therefore, research was conducted in an environment of 7 bacteria (*Pseudomonas*, *Klebsiella oxytoca*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus aureus* - MRSA and MSSA, *Enterococcus spp*) to determine the correlation between material surface (titanium alloy - Ti-13Nb-13Zr) and the environment in which it is set as well as the biofilm formation.

Samples of 5x15 mm were cut from the sheet with a thickness of 3 mm and prepared by the Central Workshop Gdansk University of Technology. Next all the samples were divided into two groups. One group consisted of defatted samples and the second contained both defatted and sterile.

The next step was to prepare the test-tubes with the culture medium (TSA - tryptic soy agar) and the strain of bacteria. Then to the test-tubes were introduced after the two samples and all transported to the incubator on temperature 36°C (±0,5°C) for a period of 30 days. After this time one sample is pulled out from each test-tube in order to identify biofilm by TTC Solution 1%. The same action were repeated after 60 days.

Studies were conducted in parallel with the Ti-6Al-4V in order to determine whether the chemical composition can affect the above-defined dependencies (TABLE 1). The experiments were conducted at the Department of Laboratory Medicine and Microbiology at the Hospital in Kościerzyna.

The results obtained will be presented at a conference in Rytró "Biomaterials in medicine and veterinary medicine."

References

- [3]. Assis L. A., Costa I.: Electrochemical evaluation of Ti-13Nb-13Zr, Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb alloys for biomedical application by long-term immersion tests., *Materials and Corrosion* 2007, 58, No. 5, s. 329-33

OPRACOWANIE BIORESORBOWALNYCH WIELOWARSTWOWYCH NOŚNIKÓW POLIMEROWYCH DO KONTROLOWANEGO UWALNIANIA DOKSORUBICYN

KATARZYNA STOKŁOSA¹, JANUSZ KASPERCZYK^{1,2},
PIOTR DOBRZYŃSKI², ANNA SMOLA²

¹ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH, KATEDRA I
ZAKŁAD BIOFARMACJI, UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC,
POLSKA

²CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH PAN, UL.
CURIE-SKŁODOWSKIEJ 34, 41-800 ZABRZE, POLSKA

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań uwalniania i degradacji *in vitro* do sztucznego płynu mózgowo-rdzeniowego (aCFS) dla wielowarstwowych matryc polimerowych zawierających doksorubicynę jako substancję leczniczą. Proponowany system terapeutyczny zbudowany jest z trzech warstw, tj. 2 zewnętrznych warstw kopolimeru glikolidu z ϵ -kapolaktonem i 1 wewnętrznej warstwy kopolimeru glikolidu z D,L-laktydem z 10% zawartością cytostatyka. System wielowarstwowy utworzono przez kompresję w określonych warunkach: temperatury, nacisku i czasu. Postęp degradacji został potwierdzony przy pomocy zmian mikrostruktury łańcuchów metodą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego. Kinetykę uwalniania doksorubicyny z matryc jednowarstwowych i trójwarstwowych obserwowano przy pomocy spektroskopii UV-VIS. Zastosowanie trójwarstwowej matrycy pozwoliło na zmniejszenie początkowego wyrzutu leku z powierzchni nośnika polimerowego a tym samym zmniejszenie inhibicji uwalniania do 100 godzin eksperymentu.

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 64-67]

Wstęp

Mikrostruktura łańcucha kopolimerowego jest czynnikiem determinującym degradację hydrolytyczną alifatycznych poliestrów i tym samym pozwala na sterowanie kinetyką uwolnionej substancji leczniczej. Odpowiednio zaprojektowana mikrostruktura w oparciu o warunki kopolimeryzacji oraz rodzaj inicjatora pozwala otrzymać systemy terapeutyczny zapewniające kontrolowane uwalnianie różnych substancji leczniczych [1,2]. Polimerowe materiały otrzymane w obecności nietoksycznego inicjatora cyrkonowego [3], a jako substancję leczniczą wybrano hydrofilowy antybiotyk antrycylinowy-doksorubicynę. Ten cytostatyk jest stosowany w leczeniu ostrej białaczki limfoblastycznej i szpikowej, chłoniakach, mięsaka Kaposiego, raka piersi, raka pęcherza moczowego, raka płuc, raka tarczycy, raka żołądka, raka wątroby [4]. Podanie dożylnie doksorubicyny wywołuje oprócz kardiotoksyczności szereg innych skutków ubocznych tj. supresję szpiku, wysięk, nudności, wymioty, zapalenie jamy ustnej. Zastosowanie liposomalnej doksorubicyny (Caelyx®) w raku jajnika, piersi, mięsaka Kaposiego pod względem efektu terapeutycznego jest porównywalne, natomiast zmniejszone jest ryzyko wystąpienia powikłań mięśnia sercowego [5]. Preparat Caelyx® był stosowany

ELABORATION OF BIORESORBABLE MULTI- LAYERED POLYMERIC CARRIERS FOR CONTROLLED DOXORUBICIN RELEASE

KATARZYNA STOKŁOSA¹, JANUSZ KASPERCZYK^{1,2},
PIOTR DOBRZYŃSKI², ANNA SMOLA²

¹MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, DEPARTMENT OF BIOPHARMACY,
NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

²CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS, POLISH ACADEMY
OF SCIENCES, CURIE-SKŁODOWSKA 34, 41-819 ZABRZE, POLAND

Abstract

In this work the results of in vitro release and degradation to artificial cerebrospinal fluid solution (aCFS) from multi-layered polymeric matrices containing cytostatic drug were performed. The proposed therapeutic system was constructed from three layers: the glycolide/caprolactone copolymer were used in two external layers and glycolide/D,L-lactide copolymer in internal layer containing 10-weight % of cytostatic agent. Three-layered drug release system was made by compression at suitable conditions of time, temperature and pressure. The degradation of three-layered polymeric matrices was confirmed on the basis of changes in copolymer chain microstructure using high resolution NMR spectroscopy. Kinetics of doxorubicin release from mono- and three-layered matrices was observed by UV-VIS spectroscopy. Application of three-layered matrix may be used to reduction of burst effect from polymeric carrier surface and to reduction of inhibition effect of doxorubicin release observed in first stage from mono-layered matrix.

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 64-67]

Introduction

Microstructure of copolymer chain is a factor which determines hydrolytic degradation of aliphatic polyesters so that permit to kinetics control of released drugs. Proper microstructure design according to copolymerization conditions and type of initiator allow to obtain therapeutic system with controlled release of different drugs and in consequence reduction of side effects [1,2]. Polymeric materials were synthesized in the presence of non-toxic zirconium initiator [3], and hydrophilic anthracycline antibiotic-doxorubicin was chosen as drug. This cytostatic is used in acute lymphoblastic leukemia and chronic myeloid leukemia, lymphomas, Kaposi's sarcoma, breast, bladder, lung, thyroid, gastric and liver cancers [4]. Intravenously administration of doxorubicin causes many side effects such as cardiotoxicity, bone marrow suppression, loss of hair, nausea, vomiting, and stomatitis. The therapeutic effect of liposomal doxorubicin (Caelyx®) used in ovary cancer, breast cancer and Kaposi's sarcoma is comparable with intravenous doxorubicin but decrease the risk of complications in cardiac muscle [5]. Caelyx® was used in brain glioma therapy but problem with dose selection was observed what induced hemorrhage in tumor area and also damage of surrounding tissues [6]. The aim of investigations was reduction of burst effect from polymeric carrier surface and reduction of inhibition effect of doxorubicin release by application of three-layered

w terapii glejaka mózgu jednak wystąpił problem z dawką dawki co wywołało krwawienie w obrębie guza oraz uszkodzenia tkanek otaczających [6]. Celem badań było zmniejszenie początkowego wyrzutu leku oraz inhibicji uwalniania doxorubicyny poprzez zastosowanie trójwarstwowej matrycy wykonanej z biodegradowalnych polimerów o określonej budowie. Wcześniejsze badania jednowarstwowych bioresorbowalnych systemów uwalniania doxorubicyny potwierdziły obecność wyrzutu leku z powierzchni matrycy a następnie inhibicję uwalniania leku z masy matrycy, której przyczyną są oddziaływania między grupami hydroksylowymi leku a grupą karbonylową kopolimeru [7]. Implantowanie trójwarstwowej matrycy polimerowej z doxorubicyną do łoża pooperacyjnej może spowodować korzystny efekt terapeutyczny w leczeniu glejaka mózgu.

Materialy

Zastosowano 2 rodzaje kopolimerów: kopolimer glikolidu z D,L-laktydem (PGDLA) i kopolimer glikolidu z ϵ -kapolaktonem (PGCA), o różnej mikrostrukturze łańcucha poliestrowego i zawartości jednostek komonomerycznych do wykonania implantacyjnego systemu terapeutycznego doxorubicyny. Kopolimery zostały otrzymane w masie [8,9] w temperaturze 100-130°C, a jako inicjator zastosowano nietoksyczny acetyloacetonian cyrkonu ($Zr(Acac)_4$). W celu usunięcia śladów nie przereagowanych komonomerów rozpuszczono je w chloroformie i wytrącono w metanolu a następnie suszono pod próżnią. Zawartość procentowa cytostatyka w matrycach poliestrowych wynosiła 10%. Sztuczny płyn mózgowo-rdzeniowy (aCFS) otrzymano przez połączenie 2 roztworów soli w proporcji 1:1. Pierwszy roztwór zawierał (NaCl, KCl, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$) a drugi ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) [10].

Metody

Materialy poliestrowe scharakteryzowano pod kątem ilości jednostek komonomerycznych, mikrostruktury łańcucha przy pomocy 1H i ^{13}C NMR. Określono również ciężary cząsteczkowe metodą GPC i temperatury: topnienia i zeszklenia metodą DSC. Metodyka otrzymania pojedynczych matryc polegała na rozpuszczeniu polimeru bądź polimeru z lekiem w rozpuszczalniku polarnym następnie wylaniu do formy o określonej grubości. Z folii wycięto krążki bez cytostatyka i z cytostatykiem o średnicy 1 cm i sprasowano pod naciskiem 3,4 T w 40°C przez 5 minut. Próbe kontrolną stanowiły pojedyncze krążki kopolimeru glikolidu z D,L-laktydem i doxorubicyny. Badania uwalniania cytostatyka i degradacji matryc prowadzono w układzie dynamicznym przez 336 godzin poprzez inkubację z wytrząsaniem w temperaturze 37°C. Absorbancje uwolnionej doxorubicyny oznaczono metodą UV-VIS przy długości fali $\lambda=482$ nm, a z równania krzywej wzorcowej określono stężenia uwolnionej substancji leczniczej.

biodegradable matrices with specific chain microstructure. Previous investigations of mono-layered matrix confirmed presence of burst effect and next delay of drug release from the bulk, which is caused by interactions between hydroxyl groups of drug and carbonyl group of copolymer [7]. Implantation of three-layered polymeric matrix with doxorubicin into postoperative site could cause beneficial therapeutic effect in brain glioma treatment.

Materials

Two types of copolymers were applied: copolymer of glycolide with D,L-lactide (PGDLA) and copolymer of glycolide with ϵ -caprolactone (PGCA) with different microstructure of polyester chain and content of comonomeric units for construction of implantation doxorubicin therapeutic system.. Copolymers were synthesized in bulk [8,9] at temperatures: 100-130°C, and as initiator non-toxic zirconium (IV) acetylacetonate [$Zr(Acac)_4$] was applied. In order to remove traces of unreacted comonomers mixture was dissolve in chloroform and precipitate with methanol and then dried in a vacuum. Percentage content of cytostatic in polyester matrices was 10% (w/w). aCFS was prepared by combination of two solutions in ratio 1:1. First solution contained (NaCl, KCl, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$) and second one ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) [10].

Methods

Polyester materials were characterized according to amount of comonomeric units and chain microstructure by 1H and ^{13}C NMR spectroscopy. Molecular masses by GPC and temperatures: melting and glass transition by DSC were also defined. Methodology of mono-layered matrices formation consists of dissolving polymer or polymer with drug in polar solvent and next casting to form with defined thickness. Discs without and with cytostatic agent ($d=1$ cm) were cut out and compressed 5 minutes under pressure 3,4 T at 40°C. Blank sample was mono-layered PGDLA discs with doxorubicin. Cytostatic release studies and degradation of matrices were conducted by incubation at 37°C with shaking. The values of absorbances of released doxorubicin were indicated by UV-VIS method at $\lambda=482$ nm, standard curve equation permit to define concentrations of release drug.

Results

Physicochemical properties and microstructure parameters of copolymer chain for polymeric carriers was presented in TABLE 1 and analysis of microstructure changes with degradation time was shown in TABLE 2. Release profile of doxorubicin from mono- and three-layered matrices and also 1H and ^{13}C NMR spectra of these matrices was shown at FIGURE 1.

TABELA 1. T_m : temperatura topnienia, T_g : temperatura zeszklenia, M_n : liczbowo średni ciężar cząsteczkowy, D: polidispersyjność, l^e : eksperymentalna średnia długość bloków, R: stopień randomizacji, k: udział jednostek komonomerycznych w łańcuchu kopolimeru.

TABLE 1. T_m : melting temperature, T_g : glass-transition temperature, M_n : number average molecular weight, D: polydispersity, l^e : experimental average length of blocks, R: degree of randomness, k: ratio of comonomeric units in copolymer chain.

Rodzaj nośnika Type of carrier	T_m °C	T_g °C	M_n [kDa]	D	k	l^e	R
PGDLA	100.2	54.9	44	2,067	GG/DL=29/71	$l^e_{GG}=1.771$, $l^e_{DL}=4.34$	0.29
PGCA	55.6	-54.2	64	2,9	GG/Cap= 9.4/90.6	$l^e_{GG}=0.568$, $l^e_{Cap}=5.47$	1.06

Wyniki

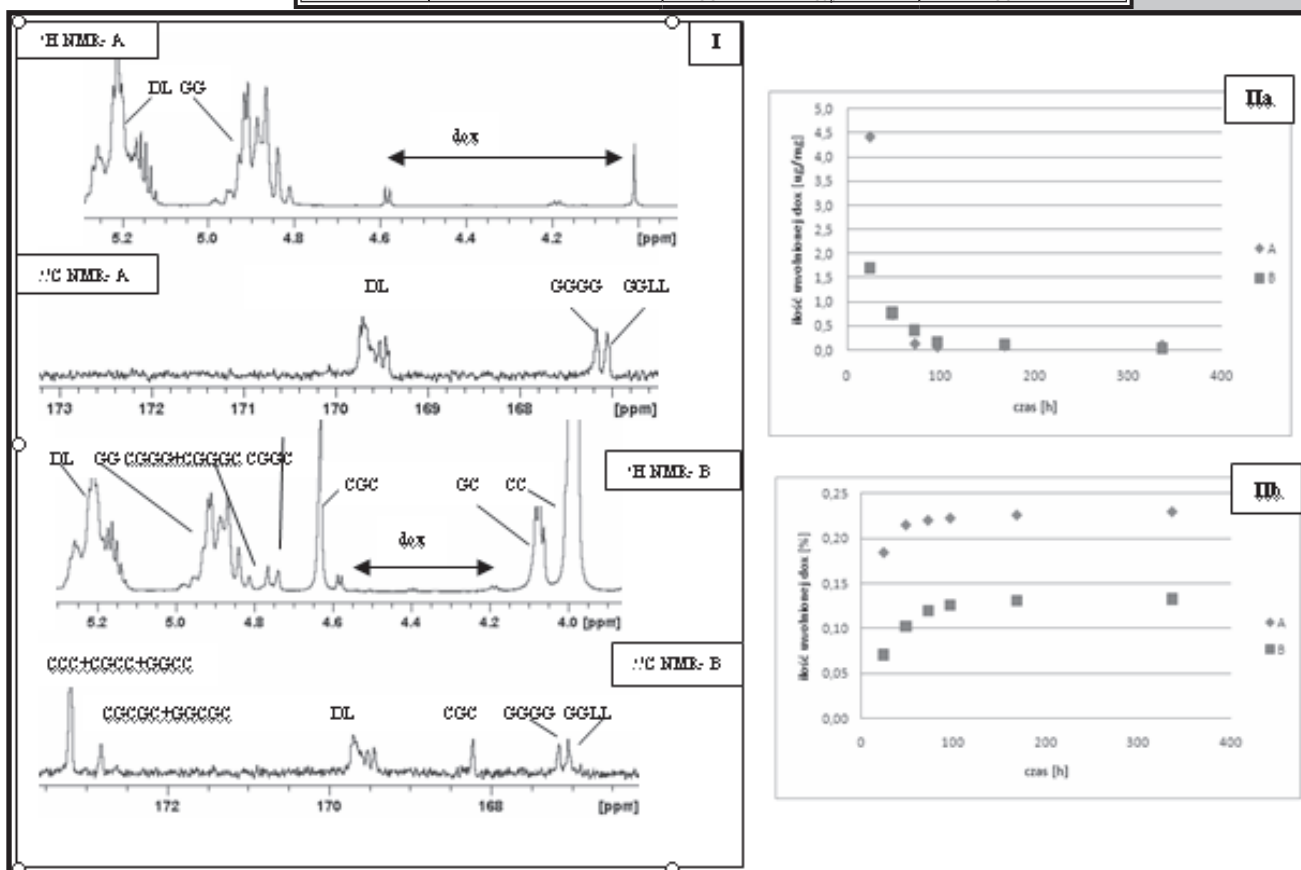
Właściwości fizykochemiczne oraz parametry mikrostruktury łańcucha kopolimerowego nośników polimerowych przedstawiono w TABELI 1, a analizę zmian mikrostruktury z czasem degradacji w TABELI 2.

Profil uwalniania dokсорubicyny z matryc pojedynczych i potrójnych a także widma ^1H i ^{13}C NMR tychże matryc pokazano na RYS.1

TABELA 2. Matryca jednowarstwowa z cytostatykiem: A- w czasie 0, B- po tygodniu degradacji, C- po 2 tygodniach degradacji. Matryca trójwarstwowa z cytostatykiem: D- w czasie 0, E- po tygodniu degradacji, F- po 2 tygodniach degradacji.

TABLE 2. Mono-layered matrix with cytostatic agent: A- at the initial time, B- after 1 week, C- after 2 weeks. Three-layered matrix with cytostatic agent: D- at the initial time, E- after 1 week, F- after 2 weeks

Matryca Matrix	k	I^e	R
A	GG/DL=28/72	$I^e_{GG}=2,29$; $I^e_{DL}=5,88$	$R_{PGDLA}=0,39$
B	GG/DL=30,5/69,5	$I^e_{GG}=1,94$; $I^e_{DL}=4,40$	$R_{PGDLA}=0,49$
C	GG/DL=30,4/69,6	$I^e_{GG}=1,82$; $I^e_{DL}=4,17$	$R_{PGDLA}=0,51$
D	GG/DL=28/72, GG/Cap=9,5/90,5	$I^e_{GG}=1,89$; $I^e_{DL}=4,86$ $I^e_{GG}=0,55$; $I^e_{Cap}=5,19$	$R_{PGDLA}=0,471$, $R_{PGCA}=1,10$
E	GG/DL=30,9/69,1 GG/Cap=9,7/90,3	$I^e_{GG}=2,00$; $I^e_{DL}=4,47$ $I^e_{GG}=0,55$; $I^e_{Cap}=5,13$	$R_{PGDLA}=0,474$, $R_{PGCA}=1,10$
F	GG/DL=30,8/69,7 GG/Cap=9,8/90,2	$I^e_{GG}=1,86$; $I^e_{DL}=4,17$ $I^e_{GG}=0,56$; $I^e_{Cap}=5,13$	$R_{PGDLA}=0,51$, $R_{PGCA}=1,10$



Rys.1 I-Widma ^1H i ^{13}C NMR, IIa- Dzienna dawka uwolnionej dokсорubicyny, IIb-kumulacyjne uwalnianie dokсорubicyny: A- jednowarstwowa matryca, B-trójwarstwowa matryca.

FIG.1 I- ^1H and ^{13}C NMR spectra, IIa-Daily dose of released doxorubicin, IIb-Cumulative release of doxorubicin: A-mono-layered matrix, B- three-layered matrix

Wnioski

Analiza parametrów mikrostruktury metodą NMR potwierdziła budowę blokową PGDLA i statystyczną PGCA. Badania degradacji matryc pojedynczych i potrójnych z cytostatykiem udowodniły wzrost stopnia randomizacji i udziału jednostek glikolidowych w czasie 1 tygodnia, co świadczy o wymyciu oligomerów kwasu mlekowego w początkowej fazie badań. Dzielne dawki uwolnionej dokсорubicyny (RYS.1 IIa) oraz kumulacyjne uwalnianie dokсорubicyny (RYS.1 IIb) z matrycy pojedynczej (A) i trójwarstwowej (B) wskazują na

Conclusions

The analysis of microstructure parameters by NMR method have confirmed block structure of PGDLA and random structure of PGCA. Degradation investigations of mono- and three-layered matrices with cytostatic agent have proved increase of randomness degree and feed mole fraction of glycolide during 1 week, what is connected with elution of lactic acid oligomers at initial phase of studies. Daily doses of released doxorubicin (FIG.1 IIa) and also cumulative doxorubicin release (FIG.1 II b) from mono- (A) and three-layered matrix (B) indicate 1,75-times lower cytostatic burst from three-layered matrix surface.

zmniejszenie 1.75-krotne wyrzutu cytostatyka z powierzchni matrycy trójwarstwowej.

Podziękowania

Badania były finansowane przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, nr umowy KNW-1-033/09

Piśmiennictwo

- [1] Kryczka T., Bero M., Kasperczyk J., Dobrzynski P., Marciniak B., Popielarz-Brzezińska M., Grieb P.: In vitro release of cytotoxic nucleoside analogs from lactide-caprolactone and lactide-glycolide copolymers, *Acta Biochim. Pol.*, 2002; 49, 205-210
- [2] Buntner B., Nowak M., Kasperczyk J., Ryba M., Grieb P., Walski W., Dobrzynski P., Bero M.: The application of microspheres from the copolymers of lactide and ϵ -caprolactone to the controlled release of steroids, *J. Control. Release*, 1998; 56, 159-167
- [3] A Czajkowska, M.Bero, P.Dobrzyński, J.Kasperczyk: „Badanie biogodności kopolimerów glikolidu i laktidy otrzymywanych z wykorzystaniem nowego inicjatora cyrkonowego lub cynowego w oparciu o badania in vitro”, *Inżynieria Biomateriałów*, 2001, 17
- [4] G.Minotti, P.Menna, E.Salvatorelli, G.Cairo, L.Gianni: “Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity”. *Pharmacol Rev*, 2004; 56: 186-188.
- [5] S.Szmit, C.Szczylik: “Doksorubicyny pegylowane a ryzyko powikłań sercowo-naczyniowych”, *Współczesna Onkologia*, 2009; 13, 1-8

Acknowledgements

Studies were supported by Medical University of Silesia in Katowice, contract no KNW-1-033/09

References

- [6] R.Zhou, R.Mazurchuk, R.M.Straubinger: “Antivascular effects of doxorubicin-containing liposomes in an intracranial rat brain tumor model”, *Cancer Research*, 2002; 62: 2561-2566
- [7] J.Kasperczyk, K.Stokłosa, P.Dobrzyński, K.Stępień, B.Kaczmarczyk, A.Dzierżęga-Lęcznar, *International Journal of Pharmaceutics* 2009; 382: 124-129
- [8] P.Dobrzynski, J.Kasperczyk, H.Janeczek, M.Bero: “Synthesis of Biodegradable Copolymers with the Use of Low Toxic Zirconium Compounds. 1. Copolymerization of Glycolide with L-Lactide Initiated by $Zr(Acac)_4$ ”, *Macromolecules*, 2001; 34: 5090-5098
- [9] S.Li, P.Dobrzynski, J.Kasperczyk, M.Bero, Ch. Braud, M.Vert: “Structure-Property Relationships of Copolymers Obtained by Ring-Opening Polymerization of Glycolide and ϵ -Caprolactone. Part 2. Influence of Composition and Chain Microstructure on the Hydrolytic Degradation”, *Biomacromolecules*, 2005; 6: 489-497
- [10] www.alzet.com

BIODEGRADOWALNY POLIMEROWY SYSTEM UWALNIANIA RADIOUCZULACZA- BADANIA IN VITRO

ANDRZEJ BUSZMAN^{1*}, JANUSZ KASPERCZYK^{1,2},
BOŻENA JARZĄBEK¹, KATARZYNA STOKŁOSA², ANNA SMOLA¹

¹POLSKA AKADEMIA NAUK,
CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH,
UL. M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, 41-819 ZABRZE, POLSKA

²ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,
KATEDRA I ZAKŁAD BIOFARMACJI,
UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA

*MAILTO: ANDRZEJ.BUSZMAN@GMAIL.COM

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań uwalniania radiouczulacza metronidazolu z jednowarstwowych oraz trójwarstwowych matryc kopolimeru glikolidu z laktidem do sztucznego płynu mózgowo-rdzeniowego ACFs. Przeprowadzono analizę mikrostruktury łańcuchów polimerowych w oparciu o spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego. Badanie uwalniania leku prowadzono w systemie dynamicznym z regularną wymianą buforu we fiolkach poddanych wytrząsaniu. Ekstrakty analizowano metodą spektrometrii UV-VIS. Równolegle prowadzono badania

BODEGRADABLE POLYMERIC SYSTEM RELEASING RADIOSENSITIZER- THE IN VITRO STUDIES

ANDRZEJ BUSZMAN^{1*}, JANUSZ KASPERCZYK^{1,2},
BOŻENA JARZĄBEK¹, KATARZYNA STOKŁOSA², ANNA SMOLA¹

¹POLISH ACADEMY OF SCIENCES,
CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,
34. M.SKŁODOWSKIEJ-CURIE STREET, 41-819 ZABRZE, POLAND

²MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA,
DEPARTMENT OF BIOPHARMACY,
1 NARCYZÓW STREET, 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

*MAILTO: ANDRZEJ.BUSZMAN@GMAIL.COM

Abstract

In this paper the results of radiosensitizer metronidazole release investigation from mono- and triple-layered copolymeric matrices in artificial cerebro-spinal fluid solution (ACFs) are presented. The analysis of polymeric chain microstructure by the NMR has been conducted. Drug release study was performed in the dynamic system with regular buffer exchange in constantly stirred glass ampoules. The extracts were analyzed by the UV-VIS spectrometry. Drug carrying matrices degradation research were conducted to evaluate possible changes in polymeric

degradacji matrycy z lekiem pod kątem oceny zmian w mikrostrukturze łańcucha polimerowego. Badania wykazały znacznie szybszą degradację matrycy wykonanych z kopolimeru glikolidu z D,L-laktydem w porównaniu z matrycami z kopolimeru glikolidu z L-laktydem. Ponadto wykazano że opłaszczenie matrycy zawierającej lek polimerem bez leku (matryce trójwarstwowe) zapobiega nagłemu wyrzutowi leku z powierzchni w pierwszych dniach uwalniania.

Słowa kluczowe: Poliestry alifatyczne, systemy kontrolowanego uwalniania leków, glejak mózgu, metronidazol

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 67-71]

Wprowadzenie

Polimery biodegradowalne, a szczególnie poliestry alifatyczne stanowią grupę biomateriałów stosowanych w medycynie przy regeneracji uszkodzonych tkanek (jako tzw. scaffoldy), w leczeniu ran (jako nici i klipsy chirurgiczne) oraz jako membranowe i matrycowe systemy kontrolowanego uwalniania leków [1]. Ze względu na ich bezpieczeństwo, biodegradowalność, dostępność i uniwersalność znalazły zastosowanie w terapiach przeciwnowotworowych, uzależnień, infekcji i szczepieniach. Wyniki degradacji poliestrów alifatycznych i wpływ mikrostruktury łańcucha polimerowego na degradację hydrolityczną pozwalają projektować bioresorbowalne systemy kontrolowanego uwalniania oraz wpływać na czas ich degradacji i stężenie uwalnianego leku [2]. W leczeniu nowotworów, polimerowe systemy uwalniania leków mogą być podawane miejscowo, tj. bezpośrednio na tkankę guza lub do łoża pooperacyjnej, co stanowi niewątpliwą atut tych systemów na tle innych rozwiązań. Jest to szczególnie ważne w leczeniu nowotworów głowy i szyi, gdzie bariera krew-mózg stanowi istotną przeszkodę dla wielu leków podawanych ogólnoustrojowo. Dodatkowo, umiejscowienie polimerowego systemu uwalniania leku bezpośrednio w guzie lub w łożu pooperacyjnej minimalizuje uszkodzenia tkanki nerwowej wywołane radioterapią. Ponadto, systemy polimerowe charakteryzuje stały poziom uwalniania leku w danym okresie czasu, co jest kluczowe w terapii przeciwnowotworowej [3].

Metronidazol – należący do chemioterapeutyków lek z grupy pochodnych nitroimidazolu wykazuje działanie pierwotniakobójcze oraz bakterioobójcze wobec drobnoustrojów beztlenowych, wykazano ponadto efektywne działanie tego leku jako radioczułacza w terapii białaczek, mięsaków i raka piersi. Właściwości radioczułające metronidazolu mogą mieć zastosowanie w leczeniu innych nowotworów złośliwych jak np. glejaków, jednak dla uniknięcia cytotoksycznych działań ubocznych jego miejscowe podanie powinno być ściśle kontrolowane [4].

W niniejszej pracy zostały przebadane kopolimery glikolidu z D,L-laktydem oraz glikolidu z L-laktydem ze specyficzną mikrostrukturą łańcuchów kopolimerowych pod kątem zastosowania jako wszczepialne systemy terapeutyczne.

Materiały

Materiały kopolimerowe poli(glikolid-co-D,L-laktyd) oraz poli(glikolid-co-L-laktyd) zostały zsyntezowane w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrze, metodą kopolimeryzacji z otwarciem pierścienia prowadzoną w masie z użyciem $Zr(acac)_4$ jako nietoksycznego inicjatora przy stosunku molowym inicjator/komonomery 1/1000. Otrzymane kopolimery zostały rozpuszczone w chloroformie, wytrącone w metanolu a następnie wysuszone w temperaturze 25°C pod normalnym i zmniejszonym

chain microstructure. The results showed that matrices containing poly(glycolide-co-D,L-lactide) demonstrate higher degradation rate than matrices containing poly(glycolide-co-L-lactide). It has been proved that drug carriers coated with drug-free polymer (triple-layered matrices) prevents from burst effect.

Keywords: Aliphatic polyesters, drug delivery system, brain glioma, metronidazole

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 67-71]

Introduction

Biodegradable polymers, especially aliphatic polyesters are materials used for medical applications such as tissue repair and regeneration (scaffolds), wound closure (sutures, self-clamping clips, surgical pins) and drug delivery systems (membrane, matrix, injectable etc.) [1]. Due to their safety, biodegradability, availability and versatility they are used in the areas of cancer therapy, drug addiction, infection and vaccination. The influence of polymeric chains microstructure on hydrolytic degradation allow to design the bioresorbable controlled release systems and to control carrier degradation time as well as concentration of released drug [2]. In cancer treatment, polymeric drug delivery systems have the advantage of being placed directly into the tumor area or into the tumor cavity after the resection. This is very important especially in brain and neck cancers, when the blood-brain barrier (BBB) may prevent some systemically administered drugs from reaching their destination. Moreover, implantation of polymeric drug delivery system directly into tumor site or tumor cavity after resection minimizes damage or toxic effects for the nerve tissue caused by radiotherapy. Furthermore, polymeric delivery systems provide stable release of the drug in certain period of time, which is essential for the successful cancer therapy [3].

Metronidazole is nitroimidazole antibiotic medication used for anaerobic bacteria and protozoa but has also been proved as an efficient radiosensitizer in treatment of leukemia, sarcoma and breast cancer. Its radiosensitive properties seem to be interesting in treatment of other malignant tumors like glioma however local administration needs to be controlled due to potential cytotoxic side effects [4].

In this study, copolymer of poly(glycolide-co-D,L-lactide) and copolymer of poly(glycolide-co-L-lactide) with specific chain microstructure have been chosen as carriers of metronidazole for implantable therapeutic system.

Materials

Polymeric materials poly(glycolide-co-D,L-lactide) and poly(glycolide-co-L-lactide) were synthesized in Centre of Polymer and Carbon Materials PAsci, Zabrze by ring-opening copolymerization in bulk with $Zr(acac)_4$ as a non toxic initiator with initiator/molar ratio (I/M) of 1/1000. Obtained copolymers were dissolved in chloroform, precipitated in methyl alcohol then dried at 25°C and under reduced pressure to constant weight. Metronidazole was purchased from Sigma Aldrich. Artificial Cerebro-spinal Fluid solution (ACFs) was prepared by mixing proper amounts of NaCl, KCl, $CaCl_2$, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ and $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ with distilled water.

Methods

Materials properties examination

The copolymers composition was confirmed by the 1H -NMR analysis and the chain microstructure was examined by the ^{13}C -NMR measurement (600 MHz on AVANCE

ciśnieniem do stałej masy. Metronidazol został zakupiony w SIGMA ALDRICH. Sztuczny płyn mózgowo rdzeniowy (ACFs) otrzymano w wyniku dokładnego rozpuszczenia i zmieszania odpowiednich naważek soli NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂•6H₂O, Na₂HPO₄•7H₂O i NaH₂PO₄•H₂O w wodzie destylowanej.

Metody

Badania właściwości materiałów

Skład chemiczny badanych polimerów oraz mikrostruktura łańcuchów zostały określone za pomocą analizy ¹H- i ¹³C-NMR (spektrometr 600 MHz AVANCE II Ultra Shield Plus, Bruker). Masy cząsteczkowe kopolimerów Mn i Mw zostały oznaczone metodą chromatografii żelowej (GPC, Physics SP 8800 chromatograph). Temperatura zeszklenia T_g oraz topnienia T_m badanych kopolimerów zostały wyznaczone metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej (TA DSC 2010 apparatus, TA Instruments, New Castle, DE).

Otrzymanie matryc polimerowych oraz krążków jedno- i trójwarstwowych

Matryce z lekiem otrzymano przez rozpuszczenie naważki polimeru w CH₂Cl₂, wymieszanie go z roztworem zawierającym odpowiednią ilość metronidazolu i wylanie na specjalną formę teflonową. Po odparowaniu rozpuszczalnika w temperaturze pokojowej matryce suszono w suszarce próżniowej. Następnie wycięto krążki o średnicy 10mm, grubości 0,5mm, zawierające 5% wag metronidazolu. Krążki bez leku otrzymano analogicznie, wyjąwszy dodatek roztworu metronidazolu. Krążki trójwarstwowe otrzymano przez umieszczenie krążka z lekiem pomiędzy dwoma krążkami bez leku i sprasowanie w określonych warunkach temperatury, czasu i nacisku.

Badanie uwalniania metronidazolu

Otrzymane jedno- oraz trójwarstwowe krążki umieszczono w szklanych ampułkach i dodano buforu ACFs w proporcji 1ml buforu na 15mg polimeru. Ekstrakty zbierano codziennie w okresie pierwszego tygodnia badań a następnie co 7 dni przez okres 12 tygodni. Przy każdym pobraniu ekstraktu wymieniano całą objętość buforu. Inkubacja zachodziła w temperaturze 37°C (Mettler Precision Incubator INE 400) przy równoczesnym ciągłym wytrząsaniu ampułek.

Pomiar absorbancji metronidazolu uwolnionego z krążków polimerowych do buforu ACFs

Stężenie uwolnionego metronidazolu zostało zbadane metodą spektrofotometryczną w zakresie UV (270-370nm) przy użyciu spektrometru JASCO V-570 UV-VIS-NIR. Równanie krzywej wzorcowej pozwoliło określić ilość uwolnionego leku.

Badanie degradacji krążków

Z powodu bardzo dużego tempa degradacji matryc z kopolimeru glikolidu z D,L-laktydem (całkowity czas degradacji ok. 8-10 tyg) wykonano analizę NMR tego materiału. Celem analizy było porównanie udziału jednostek komonomerycznych oraz parametrów mikrostruktury łańcucha polimerowego między matrycą niezdegradowaną a matrycą po 4 tygodniach degradacji w ACFs w 37°C.

Wyniki

Właściwości matryc polimerowych

Wyniki analiz DSC, GPC i NMR badanych polimerów zestawiono w TABELI 1. Dla obydwu materiałów przed inkubacją współczynnik randomizacji R wskazuje na budowę blokową

II Ultra Shield Plus, Bruker). The copolymers molecular masses Mn and Mw were investigated by gel permeation chromatography (GPC, Physics SP 8800 chromatograph). The copolymers glass-transition temperature T_g and melting temperature T_m were determined by differential scanning calorimetry (TA DSC 2010 apparatus, TA Instruments, New Castle, DE).

Obtaining polymer matrices and mono- and triple-layered discs

Matrices with drug were obtained by dissolving copolymers in CH₂Cl₂ and mixing with the proper amount of metronidazole solution then cast on a teflon plate with the special casting device. After evaporating at ambient temperature, films were dried under reduced pressure. Then discs of 10mm diameter and 0,5mm thick were cut out from the matrices each containing 5% w/w of drug. Drug-free discs were obtained in similar way, without the drug addition. Triple-layered discs were obtained by press moulding one metronidazole carrying disc put between two drug-free discs in proper conditions of temperature, time and force.

Metronidazole release investigation

Obtained mono and triple layered discs were put into glass ampoules and filled with amount of ACFs proportional to disc's weight (1ml of ACFs per 15mg of polymer). Extracts were gathered every day during the first week of the study and then once each following week. Whole amount of buffer was changed with every extract sample gathering. During incubation at 37°C (Mettler Precision Incubator INE 400) release of metronidazole were examined for about 12 weeks with constant shaking.

Absorbance measurement of metronidazole released to ACFs by UV-VIS spectrometry

Concentrations of metronidazole released were analyzed by absorbance measurements of drug in the UV-range (270-370nm) by JASCO V-570 UV-VIS-NIR spectrometer. Equation of standard curve allowed to determine the amount of metronidazole released.

Discs degradation analysis

Due to the very fast of poly(glycolide-co-D,L-lactide) degradation rate (total degradation time estimated for about 8-10 weeks) further ¹H and ¹³C NMR analysis were conducted for this material. The aim of this study was to compare the comonomeric ratio and chain microstructure between non-degraded matrix and matrix after 4 weeks of incubation in ACFs at 37°C.

Results

Polymeric matrices properties

The results of DSC, GPC and NMR analysis are gathered in TABLE 1. for both materials randomization factor R indicates block chain microstructure.

Degradation analysis

The NMR study results for the poly(glycolide-co-D,L-lactide) after 4 weeks of incubation showed in TABLE 1. indicate significant changes in both copolymer composition and chain microstructure. The average block length was decreased, especially for the lactidyl blocks and the randomization factor increased to value indicating statistic chain microstructure.

Metronidazole release profiles analysis

On the FIG.1. rapid drug release in first 24 hours of incubation can be seen. It's known as the burst effect and

Analiza degradacji

Wyniki analizy NMR dla kopolimeru glikolidu z D,L-laktydem po 4 tygodniach inkubacji pokazane w TABELI 1 wskazują na znaczące zmiany jakie zaszły w składzie polimeru jak i w mikrostrukturze łańcucha. Obniżeniu uległa średnia długość bloków, zwłaszcza laktydylowych, a współczynnik randomizacji wzrósł do poziomu wskazującego na budowę statystyczną łańcucha.

Analiza profili uwalniania metronidazolu

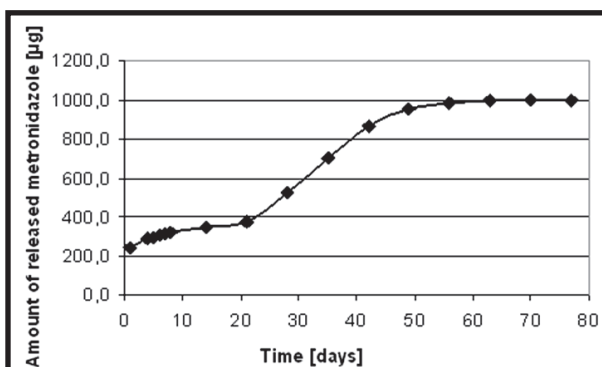
Na RYS.1.widoczny jest nagły wyrzut leku w ciągu pierwszych 24 godzin inkubacji. Jest to spowodowane wymyciem cząsteczek leku z powierzchni, niepożądane w systemach uwalniania leków. Podobną sytuację przedstawia RYS.3. gdzie 25% całej puli leku uwalnia się w ciągu pierwszej doby inkubacji. Porównanie tych dwóch matryc

is unwanted in drug delivery systems. Similar situation is shown on FIG.3. where 25% of total drug reservoir is

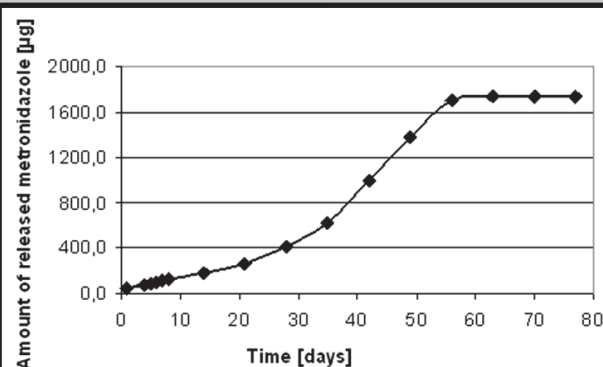
TABELA 1. Zestawienie właściwości matryc polimerowych w oparciu o analizy DSC, GPC i NMR. GA:LA ratio – stosunek jednostek glikolidylowych do laktydylowych; L^e_{GG} – średnia długość bloków glikolidylowych; L^e_{LL} – średnia długość bloków laktydylowych; R – współczynnik randomizacji; n/e – nie badano.

TABLE 1. Set of polymeric material properties based on DSC, GPC and NMR analysis. GA:LA – glycolidyl units to lactidyl units molar ratio; L^e_{GG} – average glycolidyl block length; L^e_{LL} – average lactidyl block length, R – randomization factor; n/e – not examined

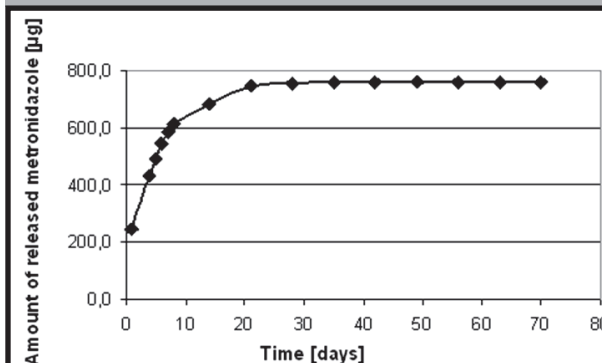
Analysis Material	DSC		GPC		NMR			
	Tg [°C]	Tm [°C]	Mm [kDa]	Mw [kDa]	GA:LA ratio	L^e_{GG}	L^e_{LL}	R
poly(glicolide-co-L-lactide) before incubation	60,6	83,6	75,3	254,7	15,9:84,1	1,88	9,96	0,37
poly(glycolide-co-D,L-lactide) before incubation	51,0	110,9	46,4	99,2	52,8:47,2	2,93	2,62	0,55
poly(glycolide-co-D,L-lactide) after 4 weeks of incubation	n/e	n/e	n/e	n/e	80,9:19,1	1,95	0,50	2,44



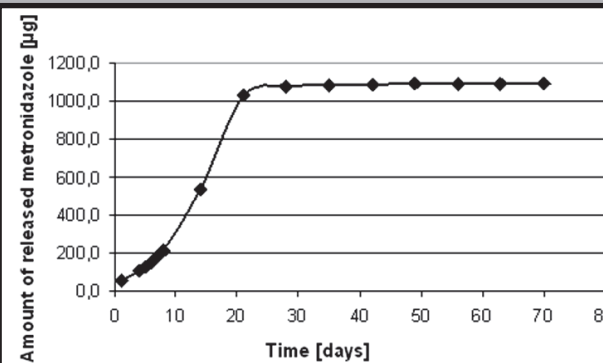
RYS.1. Wykres kumulacyjny uwalniania metronidazolu do płynu ACFs in vitro z matrycy jednowarstwowej zawierającej kopolimer glikolidu z L-laktydem.
FIG.1. In vitro cumulative release of metronidazole to ACFs from mono-layered matrix containing copolymer of glycolide and L-lactide



RYS.2. Wykres kumulacyjny uwalniania metronidazolu do płynu ACFs in vitro z matrycy trójwarstwowej zawierającej kopolimer glikolidu z L-laktydem.
FIG.2. In vitro cumulative release of metronidazole to ACFs from three-layered matrix containing copolymer of glycolide and L-lactide



RYS.3. Wykres kumulacyjny uwalniania metronidazolu do płynu ACFs in vitro z matrycy jednowarstwowej zawierającej kopolimer glikolidu z D,L-laktydem.
FIG.3. In vitro cumulative release of metronidazole to ACFs from mono-layered matrix containing copolymer of glycolide and D,L-lactide



RYS.4. Wykres kumulacyjny uwalniania metronidazolu do płynu ACFs in vitro z matrycy trójwarstwowej zawierającej kopolimer glikolidu z D,L-laktydem.
FIG.4. In vitro cumulative release of metronidazole to ACFs from triple-layered matrix containing copolymer of glycolide and D,L-lactide

wskazuje, iż profil uwalniania z matrycy otrzymanej z L-laktydu jest bardziej zrównoważony a uwalnianie trwa do 50 dni, podczas gdy z matrycy otrzymanej z D,L-laktydu zaledwie do 25 dni.

Matryce trójwarstwowe widoczne na RYS.2. i RYS.4. nie wykazują wyrzutu z powierzchni, uwalniając lek w umiarkowanym tempie do 55 dni (matryca z L-laktydem) lub do 25 dni dla matrycy z D,L-laktydem.

Wnioski

Obecność dwóch dodatkowych krążków bez leku opłaszczających nośnik radiocuczulacza chroni przed wystąpieniem wyrzutu leku z powierzchni. Ponadto matryce 3-warstwowe wykazują bardziej zrównoważony profil uwalniania niż 1-warstwowe. Zwiększenie udziału jednostek L-laktydylowych w matrycy kopolimerowej zapewnia dłuższy czas degradacji jak również dłuższe uwalnianie leku.

Szybka degradacja kopolimeru otrzymanego z D,L-laktydu związana jest ze znacznymi zmianami w mikrostrukturze łańcucha i powoduje wyczerpanie się puli leku w czasie krótszym niż 30 dni.

Podziękowania

Praca finansowana przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach nr umowy KNW-2-045/09 oraz współfinansowana ze środków Unii Europejskiej, Europejski Fundusz Społeczny w ramach projektu RFSD 2

Piśmiennictwo

- [1] Dobrzyński P et al. Bioresorbable lactide/glycolide/TMC terpolymers with shape recovery properties. *Engineering of Biomaterials*. 2007, 63-64, 45-47
- [2] Kasperczyk J et al. Comparative study of the hydrolytic degradation of glycolide/L-lactide/e-caprolactone: terpolymers initiated by zirconium (IV) acetylacetonate or stannous octoate. *Journal of Applied Polymer Science*. 2008, 107, 3258-3266

released in the first day of incubation. However, the comparison between these two indicates that the release profile for matrix obtained from L-lactide is more stable and lasts up to 50 days while for matrix obtained from D,L-lactide only up to 25 days.

The triple-layered matrices presented on FIG.2. and FIG.4. show no signs of burst effect, releasing the drug at moderate rate up to 55 days (matrices obtained from L-lactide) or up to 25 days for matrices obtained from D,L-lactide.

Conclusions

The presence of two drug-free polymeric discs coating the drug carrier prevents from rapid drug release known as burst effect. Moreover, the triple-layered matrices indicate more stable drug release profile than mono-layered.

The increase of L-lactidyl units in copolymeric matrix ensures longer degradation time as well as longer drug releasing.

Fast degradation of copolymer containing D,L-lactidyl units is connected with significant changes in chain microstructure and causes whole drug reservoir being spent in less than 30 days.

Acknowledgements

This work was supported by Medical University of Silesia in Katowice, contract no KNW-2-045/09 and by the European Community from the European Social Fund within the RFSD 2 project.

References

- [3] Sawyer A et al. New methods for direct delivery of chemotherapy for treating brain tumors. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 2006, 79, 141-152
- [4] Wardman P. Chemical Radiosensitizers for Use in Radiotherapy. *Clinical Oncology* 2007, 19, 397-417

BADANIA MIKROTWARDOŚCI I MIKROMORFOLOGII POWIERZCHNI EKSPERYMENTALNYCH MATERIAŁÓW STOMATOLOGII ODTWÓRCZEJ

JOANNA KARAS^{1*}, KRZYSZTOF SZAMALEK^{1,2}

¹INSTYTUT CERAMIKI I MATERIAŁÓW BUDOWLANYCH,
UL. POSTĘPU 9, 02-676 WARSZAWA, POLSKA

²UNIWERSYTET WARSZAWSKI,
INSTYTUT GEOCHEMII, MINERALOGII I PETROGRAFII,
UL. ŻWIRKI I WIGURY 93, 02-089 WARSZAWA, POLSKA

*MAILTO: J.KARAS@ICIMB.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 72-75]

Wprowadzenie

Choroby jamy ustnej, a w szczególności próchnica zębów, stanowią bardzo ważny problem zdrowotny ludzkości współczesnej cywilizacji. Próchnica zębów jest procesem chorobowym polegającym na demineralizacji i proteolitycznym rozkładzie twardych tkanek zęba. Zmiany próchnicowe prowadzą do chorób zębów, miazgi, nieestetycznego wyglądu uzębienia, co prowadzi do konieczności kosztownych rekonstrukcji, leczenia endodontycznego, czy w końcu utraty zębów. Konieczne jest zatem podjęcie odpowiedniego leczenia dla zachowania zęba i zabezpieczenia przed powikłaniami, co polega głównie na usunięciu uszkodzonych tkanek zęba i umieszczeniu w miejscu ubytku materiału wypełniającego. Od wielu lat dąży się do otrzymania materiałów do odbudowy tkanek zębowych charakteryzujących się wysoką adhezją do twardych tkanek zęba, wysoką odpornością na obciążenia dynamiczne i zużycie tribiologiczne. Materiały stosowane do wypełnień i odbudowy ubytków w twardych tkankach zębowych powinny charakteryzować się długoterminową trwałością w zmiennym biochemicznym środowisku jamy ustnej. Jedną z najważniejszych wymaganych cech fizycznych tych materiałów jest twardość powierzchni, która determinuje ich ścieralność, a co za tym idzie trwałość wykonanych odbudów. Badania materiałów stosowanych do uzupełniania ubytków twardych tkanek zęba skoncentrowane są w dużym stopniu na takich zagadnieniach jak estetyka i brzeżna szczelność wypełnienia, czy też badania kinetyki uwalniania fluoru. Mniej uwagi poświęca się interakcji tych materiałów ze środowiskiem jamy ustnej. Jest to bardzo złożone środowisko, w którym materiał jest przede wszystkim w ciągłym kontakcie ze śliną, zróżnicowanymi chemicznie spożywczymi płynami, czy też poddawany działaniu wysokiej wilgotności.

Materiały stosowane do odbudowy ubytków w stomatologii odtwórczej, jak kompozyty fotoutwardzalne, czy cementy szkło-jonomerowe różnią się zasadniczo mechanizmem ich utwardzania wynikającym z różnego chemizmu. Najnowszymi materiałami przeznaczonymi do wypełnień i odbudowy tkanek zębowych są giomery [1, 2]. Giomery są hybrydowymi materiałami pochodnymi cementów szkło-jonomerowych (glass-ionomer) i materiałów kompozytowych utwardzanych przez sieciowanie oligomerów i monomerów. Giomery są więc materiałami aktywowanymi światłem, uwalniającymi jony fluorkowe i zawierającymi poza dotychczas stosowanymi wypełniaczami w kompozytach jeszcze wypełniacz będący wstępnie przereagowanym szkło-jonomerem (

STUDY ON SURFACE MICROHARDNESS AND MICROMORPHOLOGY OF EXPERIMENTAL RESTORATIVE FILLING MATERIALS

JOANNA KARAS^{1*}, KRZYSZTOF SZAMALEK^{1,2}

¹INSTITUTE OF CERAMICS AND BUILDING MATERIALS
9 POSTĘPU STREET, 02-676 WARSAW, POLAND

²UNIVERSITY OF WARSAW,
INSTITUTE OF GEOCHEMISTRY, MINERALOGY AND PETROLOGY,
93 ŻWIRKI I WIGURY STREET, 93, 02-089 WARSAW, POLAND

*MAILTO: J.KARAS@ICIMB.PL

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 72-75]

Introduction

Oral diseases, particularly dental caries, constitute a very important health problem of modern civilization of mankind. Tooth decay is a disease process involving demineralization and proteolytic distribution of dental hard tissue. Changes lead to diseases of teeth, pulp, unaesthetic appearance of teeth, which leads to the need for costly reconstruction, endodontic treatment, and eventually tooth loss. Therefore it is necessary to take appropriate treatment to preserve the tooth and to prevent complications, which mainly consists of removing the damaged tooth tissue and placement of filling material. For many years people seek to obtain dental tissue reconstruction materials with high capabilities of adhesion to hard tooth tissues, high resistance to dynamic load and tribiologic wear. Materials used for fillings and reconstruction of cavities in the hard tissues of teeth should have a long-term durability in the changing biochemical environment of the mouth. One of the most important physical characteristics required of these materials is the hardness of the surface, which determines their abrasion, and thus durability of reconstruction. The study of materials used for restoration of hard tooth tissues are focused largely on issues such as aesthetics and marginal integrity of fillings, or study of the fluoride release kinetics. Less attention is given to the interaction of these materials with the environment of the mouth. This is a very complex environment in which the material is primarily in contact with the saliva, chemically diverse liquids consumed, or exposed to high humidity.

Materials used for the reconstruction of defects in reconstructive dentistry, such as photo-curable composites or glass-ionomer cements are fundamentally different in their mechanism of hardening resulting from the different chemistry. Latest materials for fillings and dental tissue reconstruction are giomers [1,2]. Giomers are hybrid materials derived from glass-ionomer cements, and composite materials hardened by crosslinking oligomers and monomers. Giomer materials are light activated, releasing fluoride ions and, apart from the so far used fillers in the composites, containing a prereacted surface glass-ionomer filler or full prereacted glass-ionomer filler.

The aim of the study was to determine the influence of different environments of incubation in time function on the microhardness and micromorphology of surface produced for use in the reconstruction of defects in dental hard tissues of experimental materials, as giomer, composite and glass-ionomer cement.

TABELA 1. Materiały zastosowane w badaniach
TABLE 1. Materials used in research

No.	Rodzaj materiału Type of materials	Skład chemiczny Chemical composition
1	Giomer MG-6	matryca/Bis-GMA i TEG-DMA/: 30%mas. wypełniacz ze szkła K-4M: 32,5%mas. wypełniacz sz-jG-1: 32,5%mas. nanokrzemionka: 5,0%mas. matrix /Bis-GMA i TEG-DMA/:30,0%mas. glass filler K-4M: 32,5%mas. glass-ionomer filler sz-j G-1: 32,5%mas. nanosilica: 5,0%mas.
2	Kompozyt MK-4 Composite MK-4	matryca/Bis-GMA i TEG-DMA/: 30%mas. Wypełniacz ze szkła K-4M: 65,0%mas. nanokrzemionka: 5,0%mas. matrix/Bis-GMA i TEG-DMA/:30,0%mas. glass filler K-4M: 65,0%mas. nanosilica: 5,0%mas.
3	Cement sz-j z płynem dwufunkcyjnym SJZ/W Cement g-I with bifunctional liquid SJZ/W	4,45g proszku szkła/1 ml płynu, wodnego roztworu polimeru kwasu akrylowego 4,45g of glass powder/1ml of liquid, water solution of poly(acrylic acid)

surface prereacted glass-ionomer filler) lub wypełniacz będący całkowicie przereagowanym szkło-jonomerem (full prereacted glass-ionomer filler).

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu różnych środowisk inkubacji w funkcji czasu na mikrotwardość oraz mikromorfologię powierzchni wytworzonych z przeznaczeniem do odbudowy ubytków w twardych tkankach zębowych eksperymentalnych materiałów, jak giomer, kompozyt i cement szkło-jonomerowy .

Materiały patrz TABELA

Metody

Badania mikrotwardości HV0,3 wytworzonych materiałów inkubowanych do 28 dni w temp. 37°C w komorze klimatycznej, przy wysokiej wilgotności RH 90 % lub w wodzie dejonizowanej lub sztucznej ślinie o pH 6,7, wykonano przy użyciu mikrotwardościomierza cyfrowego z wgłębniakiem Vickersa serii MMT-X3, produkcji japońskiej. Dla każdej próbki wykonano po trzy oznaczenia i obliczono średnie wartości oraz odchylenia standardowe (TAB.2,3,4).

TABELA 3 Mikrotwardość HV0,3 próbek polerowanych kompozytu MK-4 inkubowanych do 28 dni w komorze klimatycznej lub w wodzie dejonizowanej lub w sztucznej ślinie

TABLE 3. Microhardness HV0,3 of polished composite MK-4 samples incubated to 28 days in climatic chamber or in deionized water or artificial saliva

Badanie po upływie [h] Test after [h]	Kompozyt MK-4 po inkubacji Composite MK-4 after incubation		
	Komora 37°C Chamber 37°C RH 90 %	Woda dejonizowana Deionized water, 37°C	Sztuczna ślina Artificial saliva, pH 6,7; 37 °C
96	56,6±0,6	56,5±2,4	55,7±3,3
168	52,9±0,6	56,3±1,1	54,8±1,0
336	51,1±1,8	53,2±2,5	52,9±1,7
408	50,8±1,2	52,4±2,8	52,5±1,6
504	51,0±2,8	51,5±2,4	53,5±1,3
672	50,3±1,7	50,4±2,7	52,4±1,3

Materials see TABLE 1.

Methods

TABELA 2 Mikrotwardość HV0,3 próbek polerowanych giomeru MG-6 inkubowanych do 28 dni w komorze klimatycznej lub w wodzie dejonizowanej lub w sztucznej ślinie

TABLE 2. Microhardness HV0,3 of polished giomer MG-6 samples incubated to 28 days in climatic chamber or in deionized water or artificial saliva

Badanie po upływie [h] Test after [h]	Giomer MG – 6 po inkubacji after incubation		
	Komora 37°C Chamber 37°C RH 90 %	Woda dejonizowana Deionized water, 37°C	Sztuczna ślina Artificial saliva, pH 6,7; 37 °C
24	54,7±0,7	54,1±2,1	56,2±1,3
96	51,9±3,6	54,3±0,3	58,6±2,1
168	51,9±5,1	51,0±1,4	57,6±1,7
336	55,4±1,3	53,1±2,9	54,4±1,1
408	54,9±3,1	52,7±2,9	53,4±2,3
504	54,3±2,3	51,8±2,6	52,8±2,1
672	53,3±1,4	51,1±0,8	51,9±0,8

Testing microhardness HV0,3 of obtained materials (TAB.1) incubated to 28 days at 37°C in a climatic chamber with high humidity RH 90% or in deionized water or artificial saliva of pH 6.7, was performed using a digital microhardness meter Vickers of MMT X3 series with microindenter, Japanese production. For each sample, three indications were performed and mean values and standard deviations were calculated (TABLE 2,3,4).

Testing of surface microstructure of the materials produced incubated for 21 days in the climate chamber or in deionized water or artificial saliva was performed using a high resolution scanning electron microscope FEI Company Model Nanos Nova 299 in high vacuum mode.

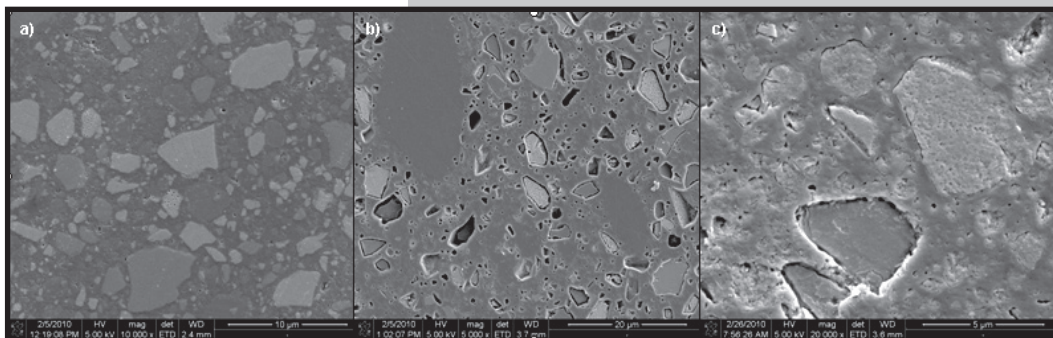
Results

TABELA 4 Mikrotwardość HV0,3 próbek cementu szkło-jonomerowego SJZ/W inkubowanych do 28 dni w komorze klimatycznej lub w wodzie dejonizowanej lub w sztucznej ślinie

TABLE 4. Microhardness HV0,3 of polished glass-ionomer cement SJZ/W samples incubated to 28 days in climatic chamber or in deionized water or artificial saliva

Badanie po upływie [h] Test after [h]	Cement SJZ/W		
	Komora 37°C Chamber 37°C RH 90 %	Woda dejonizowana Deionized water, 37°C	Sztuczna ślina Artificial saliva, pH 6,7; 37 °C
24	60,9±6,6	60,8±1,7	58,1±3,7
96	85,8±2,4	66,5±4,2	61,5±2,5
168	93,0±2,6	67,5±4,1	61,5±1,1
336	102,4±5,3	69,7±2,9	61,8±2,2
408	103,5±3,7	-	61,5±2,2
504	106,4±3,7	-	61,6±1,4
672	-	74,1±3,8	-

Badania mikrostruktury powierzchni wytworzonych materiałów inkubowanych do 21 dni w komorze klimatycznej lub w wodzie dejonizowanej lub w sztucznej ślinie wykonano przy użyciu wysokorozdzielczego skaningowego mikroskopu elektronowego firmy FEI model Nova NanoSEM 299 w trybie wysokiej próżni.



RYC.1. Giomer MG-6 po inkubacji do 21 dni w różnych warunkach środowiskowych /SEM/

FIG.1. Giomer MG-6 after incubation for 21 days in different environments /SEM/

Wyniki

Najwyższe wartości mikrotwardości w funkcji czasu oznaczono dla próbek cementu sz-j SJZ/W po inkubacji we wszystkich badanych środowiskach, a szczególnie po inkubacji w komorze klimatycznej w 37°C i RH 90% (TAB.4). Wówczas prawie dwukrotnie wyższą była mikrotwardość cementu sz-j SJZ/W po inkubacji w komorze niż w wodzie dejonizowanej. Prawdopodobnie tak wysoki wzrost mikrotwardości jest skutkiem niezakłóconego procesu tworzenia się żelu krzemionkowego na granicy ziarno szkła-matryca. Również wyższą mikrotwardość wykazuje cement sz-j SJZ/W po inkubacji w sztucznej ślinie w porównaniu z mikrotwardością po inkubacji w wodzie dejonizowanej (TAB.4). Prawdopodobnie na wzrost mikrotwardości w tych warunkach inkubacji wpływa dyfuzja jonów wapniowych i fosforanowych do struktury cementu, co w efekcie wzmacnia cement.

Giomer MG-6 wykazuje nieznacznie wyższe wartości mikrotwardości w porównaniu z kompozytem przetrzymywanym tylko w sztucznej ślinie (TAB.2,3). Po inkubacji w pozostałych warunkach środowiskowych dla giomeru MG6 i kompozytu MK4 zanotowano porównywalne wartości mikrotwardości.

Badania w mikroskopie skaningowym wykazują, że po inkubacji w komorze klimatycznej na powierzchni giomeru MG-6 widoczne są pory (RYC.1a), a po inkubacji w wodzie dejonizowanej obserwuje się liczne ubytki z powodu wymycia cząstek wypełniacza oraz słabą spójność licznych cząstek wypełniacza z matrycą (RYC.1b). Natomiast po inkubacji w sztucznej ślinie obserwuje się jedynie luźne połączenie niektórych cząstek z matrycą bez ubytków z powodu utraty cząstek (RYC.1c).

Na obrazie skaningowym kompozytu MK-4 po inkubacji w komorze klimatycznej widoczne są pory (RYC.2a), a po inkubacji w wodzie w jeszcze większym stopniu niż dla giomeru obserwuje się rozluźnienie połączenia cząstek wypełniacza z matrycą polimerową. Natomiast po inkubacji w sztucznej ślinie występują nieliczne pory i tylko na granicy wypełniacz-matryca polimerowa stwierdza się mikropęknięcia (RYC.2c).

Na podstawie dokonanych obserwacji można stwierdzić, że obrazy próbek giomeru MG-6 i kompozytu MK-4 inkubowanych w komorze klimatycznej, czy w wodzie dejonizowanej, czy też w sztucznej ślinie są zbliżone. Materiały te ulegają największej degradacji w wodzie dejonizowanej, a w szczególności dotyczy to kompozytu MK-4.

Porównując obrazy powierzchni zglądów cementu SJZ/W po inkubacji w badanych środowiskach stwierdzić należy, że najkorzystniej prezentuje się powierzchnia zglądu próbki cementu sz-j SJZ/W inkubowanej w sztucznej ślinie (RYC.3c). Nie obserwuje się na powierzchni próbki żadnych mi-

The highest value of microhardness as a function of time was determined for the samples of cement sz-j SJZ/W after incubation in all tested environments, especially after incubation in a climatic chamber at 37°C and RH 90% (TAB.4). At that time microhardness of cement sz-j SJZ/W after incubation in the chamber was twice as high as that in deionized water. Probably such a high increase in microhardness is a consequence of the smooth process of the formation of silica gel on the glass grain-matrix interface. Also there is a higher microhardness of cement sz-j SJZ/W after incubation in artificial saliva compared to the microhardness after incubation in deionized water (TAB.4). Probably the increase in microhardness in the conditions of incubation results from diffusion of calcium and phosphate ions to the structure of cement, which in consequence strengthens the cement.

Giomer MG-6 shows a slightly higher microhardness values compared to the composite placed only in artificial saliva (TABLE 2, 3). After incubation in other environmental conditions for giomer MG6 and composite MK4 comparable microhardness values were reported.

Electron microscope scanning tests show that after incubation in a climatic chamber on the surface of giomer MG-6 there are pores visible (FIG.1), and after incubation in deionized water numerous losses were observed due to leaching of fillers particles and a weak of bound of many particles of filler with the matrix (FIG.1b). However, after incubation in artificial saliva only loose connection of some particles with the matrix were noted without losses due to loss of particles (FIG.1c).

On the scanning image of composite MK-4 after incubation in a climatic chamber there are pores visible (FIG.2a), and after incubation in water to an even greater extent than in case of giomer loosening of filler particles connection with polymer matrix can be seen. However, after incubation in artificial saliva are very few pores, and only on the interface of filler-polymer matrix the micro-cracks can be seen. (FIG.2c.)

Based on the observations, it can be concluded that the images of the giomer MG-6 and MK-4 composite samples incubated in a climatic chamber, or in deionized water or in artificial saliva were similar. These materials undergo the largest degradation in deionized water, and in particular this refers to composite MK-4.

In comparing images of the surface of cement SJZ/W after incubation in the test environments, it should be noted that the sample of cement sz-j SJZ/W incubated in artificial saliva (FIG.3 c) looks the best. There are no micro-cracks on the sample surface, at the interface of glass grain-polymer matrix. The sample of cement SJZ/W after incubation in a climatic chamber (FIG.3a) or deionized water (FIG.3b) should be assessed as worse. After incubation in a climatic chamber on the sample surface there were only a few cracks at the boundary of glass grain-polymer matrix. After

kropkęnięć na granicy ziarno szkła- matryca polimerowa. Nieco gorzej należy ocenić obraz próbki cementu SJZ/W po inkubacji w komorze klimatycznej (RYC.3a) lub w wodzie (RYC.3b). Po inkubacji w komorze klimatycznej na powierzchni próbki występują obserwuje się tylko nieznaczne mikropęknięcia na granicy ziarno szkła –matryca polimerowa. Po inkubacji próbki w wodzie obserwuje się na powierzchni liczne mikropęknięcia, których nie obserwuje się po inkubacji w sztucznej ślinie.

Wnioski

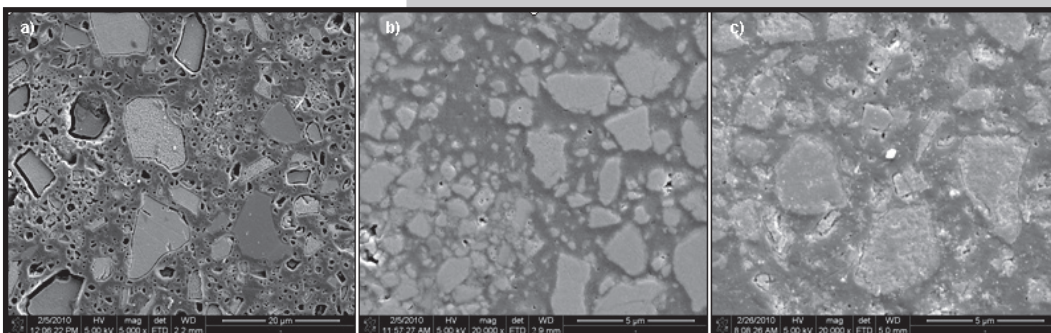
1. Najwyższe wartości mikrotwardości w funkcji czasu oznaczono dla próbek cementu szkło-jonomerowy SJZ/W po inkubacji we wszystkich badanych środowiskach, a szczególnie po inkubacji w komorze klimatycznej w 37°C i RH 90%. Prawie dwukrotnie wyższą mikrotwardość ma cement sz-j SJZ/W po inkubacji w komorze niż w wodzie dejonizowanej. Także wyższe wartości mikrotwardości stwierdzono dla cementu sz-j SJZ/W po inkubacji w sztucznej ślinie w porównaniu z cementem po inkubacji w wodzie dejonizowanej.

2. Dla giomeru MG-6 i kompozytu MK-4 oznaczono niższe wartości mikrotwardości po inkubacji w badanych warunkach środowiskowych niż dla cementu sz-j SJZ/W.

3. Próbkę giomeru MG-6 i kompozytu MK-4 inkubowane w komorze klimatycznej, czy w sztucznej ślinie ulegają dezintegracji w mniejszym stopniu niż w wodzie dejonizowanej.

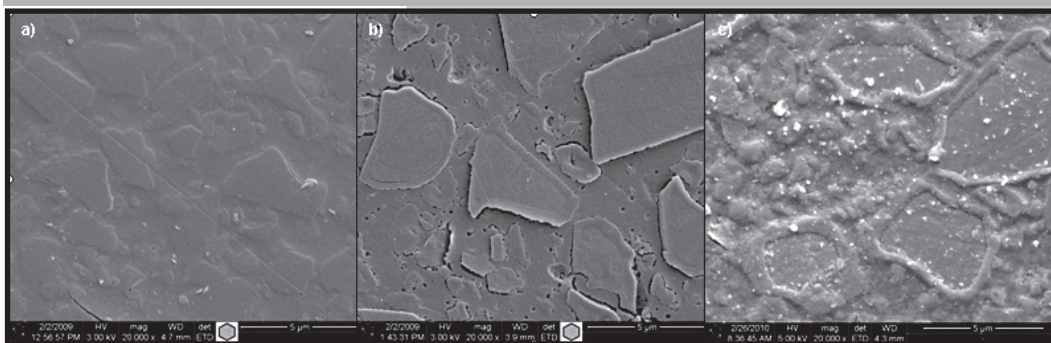
4. Spośród wytworzonych materiałów po inkubacji do 21 dni w różnych środowiskach najlepsze właściwości wykazywała powierzchnia zglądu próbki cementu sz-j SJZ/W po inkubacji w sztucznej ślinie.

5. Na podstawie przeprowadzonych badań mikrotwardości i oceny mikrostruktury można prognozować, że cement sz-j z płynem dwufunkcyjnym SJZ/W powinien w mniejszym stopniu ulegać dezintegracji i zużyciu w środowisku jamy ustnej niż inne wytworzone w trakcie eksperymentów materiały.



RYC.2. Kompozyt MK-4 po inkubacji do 21 dni w różnych warunkach środowiskowych /SEM/

FIG.2. Composite MK-4 after incubation for 21 days in different environments /SEM/



RYC.3. Cement SJZ/W po inkubacji do 21 dni w różnych warunkach środowiskowych /SEM/

FIG.3. Cement glass-ionomer SJZ/W after incubation for 21 days in different environments /SEM/

incubation of the sample in water numerous micro-cracks can be seen on the surface, which were not observed after incubation in artificial saliva.

Conclusions

1. The highest value of microhardness as a function of time were determined for samples of glass-ionomer cement SJZ/W after incubation in all tested environments, especially after incubation in a climatic chamber at 37°C and RH 90%. The microhardness of cement sz-j SJZ/W after incubation in the chamber was almost twice larger than in deionized water. Also, a higher microhardness values were found for cement sz-j SJZ/W after incubation in artificial saliva, as compared with cement after incubation in deionized water.

2. For giomer MG-6 and MK-4 composite the lower values of microhardness were determined after incubation in the test environmental conditions than for cement sz-j SJZ/W.

3. Samples of giomer MG-6 and MK-4 composite incubated in a climatic chamber, or in artificial saliva disintegrate to a lesser extent than in deionized water.

4. Among the materials produced after incubation for 21 days in different environments the best properties were shown by the sample of cement sz-j SJZ/W after incubation in artificial saliva.

5. Based on the survey of microhardness and evaluation of the microstructure, it can be predicted that the cement sz-j with bifunctional fluid SJZ/W should be subject to disintegration and wearing to a smaller extent in the environment of the mouth than other materials made during the experiment.

Piśmiennictwo

[1]. Giomer restorations-Dental Abstracts ,vol.50, 6,nov.-dec.2005, 355.

References

[2]. M.C. Sunico et al-Oper.Dent.30,may-jun.2005, 282-289.

AUTOPRZESZCZEP WIÓR CHRZĘSTNO-KOSTNYCH Z WYKORZYSTANIEM KOLAGENOWEJ BŁONY ZAPOROWEJ – BADANIA PILOTAŻOWE NAD GOJENIEM UBYTKÓW CHRZĄSTKI STAWOWEJ

EWA KARUGA*, BOGUSŁAWA ŻYWICKA, STANISŁAW PIELKA

AKADEMIA MEDYCZNA IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU,
ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA BIOMATERIAŁÓW
UL. KS. J. PONIATOWSKIEGO 2, 50-326 WROCŁAW, POLSKA
*MAILTO: EKARUGA@HOTMAIL.COM

Streszczenie

Urazy chrząstki stawowej stanowią trudny problem terapeutyczny. Poznanie budowy oraz fizjologii chrząstki pozwala zrozumieć jej funkcję oraz patomechanizm odpowiedzialny za jej niszczenie w przebiegu urazów, chorób zwyrodnieniowych oraz chorób autoimmunologicznych. Aktualnie badania nad gojeniem uszkodzeń chrząstki stawowej koncentrują się na inżynierii tkankowej, modyfikacji metod chirurgicznych oraz wykorzystaniu biomateriałów.

Badania pilotażowe przeprowadzone w Zakładzie Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów miały na celu sprawdzenie możliwości odbudowy uszkodzonej chrząstki stawowej z zastosowaniem autoprzeszczepu wiór chrzęstno-kostnych i dwuwarstwowej błony kolagenowej.

Wstępne badania w 8 i 10 tygodniu nad autoprzeszczepem wiór chrzęstno-kostnych wykazywały przewagę procesów regeneracyjnych nad reparacyjnymi.

Słowa kluczowe: procesy reparacji i regeneracji chrząstki, ubytek chrząstki stawowej, wióry chrzęstno-kostne, błona kolagenowa

[Inżynieria Biomateriałów, 99101, (2010), 76-79]

Wprowadzenie

Dane literaturowe jak i kliniczna praktyka wykazały że ubytki chrząstki stawowej ograniczające się jedynie do warstwy nieunaczynionej chrząstki nie ulegają procesowi reparaacji z uwagi na brak wystąpienia krwawienia. Uszkodzenia penetrujące do unaczynionej kości podchrzęstnej powodują powstanie krwawienia i w konsekwencji dobroczynnego skrzepu, który staje się rusztowaniem dla nowopowstającej tkanki. Tkanka wypełniająca ubytek to włóknista bliznowata tkanka łączna lub szklitopodobna o innych parametrach wytrzymałościowych niż oczekiwane.

W odróżnieniu do przeszczepów chrząstki, przeszczepy kości wykonywane są z powodzeniem. Jest to możliwe ponieważ kość ma własne naczynia krwionośne i uzyskuje ukrwienie od otaczających tkanek przez co może wgoić się w miejscu biorczym.

Od lat prowadzone badania nad autoprzeszczepem chrząstki. W większości badania te kończą się niepowodzeniem z uwagi na wykorzystanie w przeszczepie jedynie warstwy chrząstki stawowej która z czasem ulega martwicy. W badaniu wykorzystano wióry chrzęstno-kostne, zawierające fragmenty kości, które mogą uzyskać unaczynienie

AUTOTRANSPLANTATION OF CARTILAGE-BONE CHIPS USING A COLLAGEN BARRIER MEMBRANE - A PILOT STUDY OF CARTILAGE DEFECTS HEALING

EWA KARUGA*, BOGUSŁAWA ŻYWICKA, STANISŁAW PIELKA

WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY, DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL SURGERY AND BIOMATERIALS RESEARCH
2 J. PONIATOWSKIEGO STR., 50-326 WROCLAW, POLAND
MAILTO: EKARUGA@HOTMAIL.COM

Abstract

Articular cartilage injuries are a difficult therapeutic problem. Acquiring the knowledge of the structure and physiology of cartilage is a key to understanding its function and the pathogenesis responsible for its destruction in the course of injury, degenerative diseases and autoimmune disorders. Currently, research on the articular cartilage healing focus on tissue engineering, modification of surgical methods and the use of biomaterials.

Pilot studies conducted at the Department of Experimental Surgery and Biomaterials Research aimed to explore the possibilities of rebuilding the damaged cartilage using autograft cartilage-bone chips and double-layer collagen membrane.

Preliminary studies in 8 and 10 week of observation showed superiority over reparative regenerative processes.

Keywords: reparations processes and regeneration of cartilage, cartilage damage, cartilage-bone chips, articular cartilage, collagen membrane

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 76-79]

Introduction

Literature data and clinical practice have shown that articular cartilage lesions confined only to the layer of cartilage disabed of blood vessels are not able to start the repair process because of the lack of bleeding. Damage penetrating to the vascular subchondral bone may give rise to bleeding and, consequently, beneficial blood clot, which becomes a scaffold for the newly-tissue. Tissue filling the defect is fibrous scar tissue, or hyaline-like tissue with other biomechanical properties than expected.

In contrast to transplants of cartilage, bone transplants are performed successfully. This is possible because the bone has its own blood vessels and blood supply is obtained from the surrounding tissues and thus transplant will be able to ingrow in deposit place.

For years, studies cartilage transplantation are conducted. In most of these tests fail because of using only a layer of cartilage which frequently became necrotic. The study used cartilage-bone chips containing bone fragments, which can get a vascularisation from exposed subchondral bone at this point, and thus ensure the nourishment and survival of cartilage fragments. A collagen membrane, which was used in the study, had to prevent the movement of deposits chips and was developed to stabilize the clot rich in recruited

w miejscu biórczym od odsłoniętej w tym miejscu kości, a tym samym zapewnić odżywianie i przeżycie fragmentom znajdującej się na niej chrząstki. Wykorzystana w badaniu błona kolagenowa miała na celu zapobieganie przemieszczaniu się zdeponowanych w miejsce ubytku wiór oraz miała stabilizować powstały skrzep bogaty w rekrutowane ze szpiku kostnego komórki pluripotencjalne.

Cel

Badania miały na celu sprawdzenie możliwości wgojenia wiór chrzęstno-kostnych zaopatrzonych błoną kolagenową w ubytek chrząstki stawowej.

W projekcie wykorzystano zmodyfikowaną metodę chirurgicznego zaopatrywania ubytku, łącząc ją z wykorzystaniem błony zaporowej.

Materiał i metody badań

Badania doświadczalne przeprowadzono na królikach rasy Nowozelandzkiej.

I Lokalna Komisja Etyczna ds. Doświadczeń na Zwierzętach uznała wszystkie zaplanowane w ramach tego projektu badania na zwierzętach za dopuszczalne.

Operacje

Króliki znieczulano podając domięśniowo Ksylazynę w dawce 5mg / kg.m.c. (preparat: Rometar 2%, Spofa, Praha, Czechy) oraz Ketaminę w dawce 15mg / kg.m.c. (preparat: Bioketan, Vetoquinol Biovet S.A, Francja).

Po uzyskaniu pełnej analgezji otworzono lewy staw kolanowy. Ubytek o powierzchni około 5x2 mm wykonywano na kłykcii przyśrodkowym nasady dalszej kości udowej. (RYC.1) Ubytek penetrował do kości podchrzęstnej co wyznaczano krwawieniem z podłoża ubytku.

W warunkach aseptycznych rozdrobniono pobrany z ubytku materiał, aż do uzyskania postaci wiór. Kolejnym etapem było wykonanie autoprzeszczepu pozyskanych wiór w miejsce ubytku. Autoprzeszczep został przykryty błoną kolagenową OsseoGuard (prod.Biomed 3i USA)(RYC.2), którą przymocowano do powierzchni chrząstki za pomocą szwów wchłanianych oraz resorbowalnych pinów (Resor-Pin, prod. Geistlich, Switzerland). Torebkę stawową zamykano pojedynczym szwem nićmi wchłaniającymi Dexon 3-0 (prod. Syneture, UK), a skórę szwami niewchłaniającymi Amifil M (prod. SIMPO, Polska). W końcu pracy w analogiczny sposób przeprowadzono otwarcie stawu i wykonanie w nim ubytku który pozostawiano bez zaopatrzenia – kontrola. Po operacji królikom nie stabilizowano stawów kolanowych.



RYC.1. ubytek penetrujący do kości podchrzęstnej
FIG.1. Lesion penetrated to the subchondral bone

from bone marrow pluripotent cells.

Objective

The study aimed to explore the possibilities of cartilage-bone chips ingrowing in articular cartilage defect using collagen membrane. The project used a modified surgical method of cartilage defect treatment and combining it with the use of barrier collagen membrane.

Materials and methods

Experimental studies conducted on White New Zealand rabbits. The Local Ethical Commission to Animal found all planned animal tests to be admissible.

Surgical procedures

Rabbits were anesthetized by intramuscular administration of Xylazine in dose of 5mg / kg.mc (Rometar 2% Spofa, Praha, Czech Republic) and Ketamine at a dose of 15mg / kg.mc (Bioketan, Vetoquinol Biovet S. A, France).

After obtaining full analgesia the left knee joint were opened. Lesion of approximately 5x2 mm were performed on the medial condylus of femur. (FIG.1) Defect penetrated the subchondral bone was determined at the ground bleeding from the cavity.

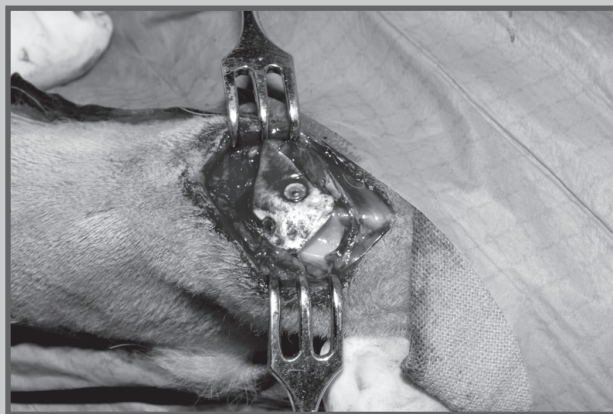
The aseptically crushed material downloaded from the loss, until a chip. The next step was the performance of autograft in place of chips obtained loss. Autotransplat was covered with collagen membrane OsseoGuard (3i prod. Biomed USA) (FIG.2), which was fixed to the surface of the cartilage with absorbable sutures and absorbable pins (Resor-Pin, man. Geistlich, Switzerland). Joint capsule were closed with a single suture absorbable threads Dexon 3-0 (prod. Syneture, UK), and skin sutures unabsorbable Amifil M (prod. SIMPO, Poland). The right limp was carried out in a similar way to open the joint and the execution of a defect, lesion has been left without supplies - check. After the operation, rabbits knee joints were not stabilized.

Postoperative observation

After the operation the rabbits showed a mild depression that provides the discomfort after surgery. This condition disappeared after one day, then the animals showed normal activity. The wound healed properly. After 10 days the skin sutures were removed.

Macroscopic and histological studies

At 8 and 10 weeks, euthanasia was performed by intravenous administration of pentobarbital (Morbital, producer



RYC.2 ubytek przykryty błoną kolagenową
FIG.2 Autotransplat covered with collagen membrane

Obserwacja pooperacyjna

Po operacji króliki wykazywały lekką osowiałość świadcząca o dyskomforcie zwierzęcia po wykonanym zabiegu. Stan ten ustąpił po jednym dniu, następnie zwierzęta wykazywały prawidłową aktywność. Rana po operacyjna goiła się prawidłowo. W 10 dniu obserwacji wszystkim królikom usunięto szwy skórne.

Badania sekcyjne i histologiczne

W 8 i 10 tygodniach wykonano eutanazję królików poprzez dożylną podanie pentobarbitalu (preparat: Morbital, producent Biowet, Puławy), w maksymalnej dawce do 80mg/kg. m.c. W trakcie wykonywanych sekcji, w pierwszej kolejności oceniano makroskopowo ranę pooperacyjną oraz wygląd stawu kolanowego. Następnie pobierano badane stawy wraz z otaczającymi je tkankami do dalszych badań histologicznych.

Preparaty barwiono hematoksyliną i eozyną (HE) oraz metodą Van Gieson (VG)

Wyniki

Badania sekcyjne makroskopowe

W 8 tygodni po operacji widoczne było pogrubienie torebki stawowej. Miejsce ubytku pokryte było białawą twardo-sprężystą tkanką.

W 10 tygodniu stwierdzono pogrubienie torebki stawowej. Ubytek pokrywała błyszcząca biaława warstwa.

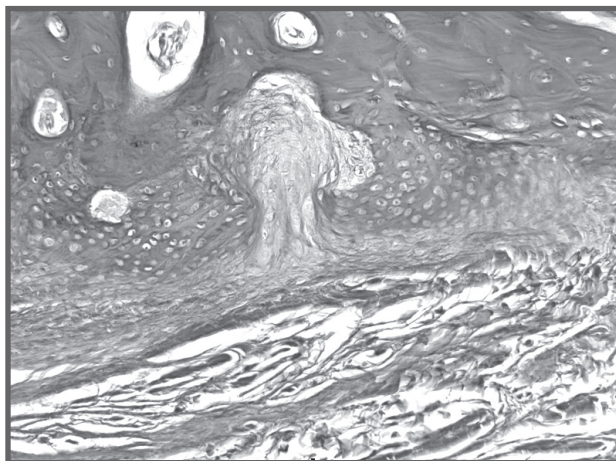
W obu terminach sekcyjnych nie udało się makroskopowo zlokalizować błony kolagenowej. Widoczne były natomiast niezresorbowane piny mocujące.

Badania mikroskopowe

W 8 tygodniu po zabiegu ubytek wypełniony był od zewnątrz błoną kolagenową, w dnie widoczna była resorpcja kości, miejscami stwierdzono obecność tkanki chrzęstnej.

Na granicy faz błona kolagenowa a tkanka kostna widoczne były pasma tkanki chrzęstnej, które wnikały w przebudowywującą się tkankę kostną (RYC.3). U podstawy widoczne były komórki pluripotencjalne oraz ogniska chrzęstnienia. W bezpośrednim sąsiedztwie kości widoczna była wysoka aktywność osteoblastów. W miejscu bezpośredniego kontaktu błony kolagenowej z tkanką kostną, bez warstwy pośredniej – wiór chrzęstno-kostnych, widoczna była aktywność osteoklastów (RYC.4)

W 10 tygodniu po implantacji miejsce ubytku wypełnione było tkanką chrzęstną z wyspami tkanki kostnej splotowatej z aktywnymi osteoblastami. Powierzchnię kłykcia pokrywała



RYC.3 ognisko chrzęstnienia 8tyg.
FIG.3 Band of cartilage penetrated to the rebuilding bone 8 weeks (40x VG)

Biowet, Puławy), in maximum dose of 80mg/kg. During autopsy the surgical wound was assessed macroscopically and appearance of the knee were observed. Subsequently, the knee joints with the surrounding tissue for further histology were taken.

Preparations were stained with hematoxylin and eosin (HE) and by Van Gieson method (VG).

Results

Macroscopic post-mortem examination

At 8 weeks after surgery was evident thickening of the articular capsule. Place of the defect was covered with a whitish, elastic hard tissue.

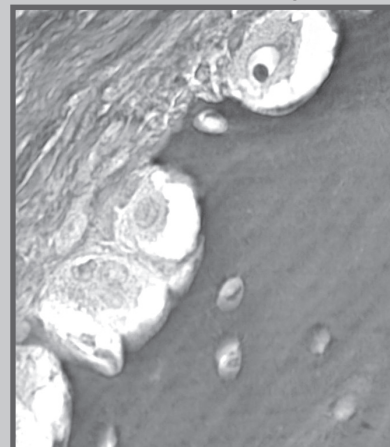
In the 10th week was thickening of the articular capsule. Loss covered with shiny whitish layer. In both periods autopsy failed to locate the macroscopic collagen membrane.

Microscopic investigations

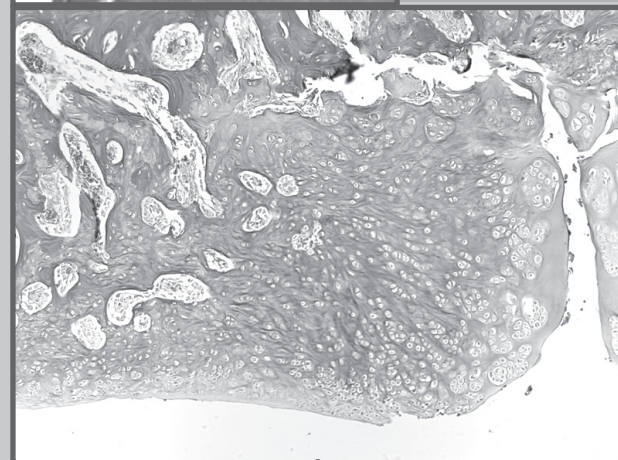
At 8 weeks after surgery defect was filled with collagen membrane on the outside, the bottom was visible bone resorption, cartilage were found in places.

At the interface collagen membrane and bone tissue, there was a band of cartilage which penetrated to the rebuilding bone (FIG.3). Pluripotent cells were visible at the base of the cartilage creating focuses. In the immediate vicinity of the bone there was a visible high activity of osteoblast. In place of direct contact of collagen membrane and the bone tissue, there was a visible activity of osteoclasts (FIG.4).

At 10-week post-implantation observation the loss was filled with islands of cartilage and spongy bone tissue with



RYC.4 Granica między błoną kolagenową a tkanką kostną – widoczne aktywne osteoklasty 8tyg.
FIG.4 of direct contact of collagen membrane and the bone tissue – osteoclasts 8 weeks (400x VG)



RYC.5 bogata w naczynia tkanka kostna, widoczna tkanka chrzęstna 10tyg.
FIG.5 Condyle surface covered with regenerating cartilage 10 weeks (100x VG)

regenerująca się tkanka chrzęstna lub włóknista tkanka łączna(RYC.5). W sąsiadującej tkance kostnej widoczne były liczne naczynia krwionośne świadczące o procesach przebudowy.

W ubytku do 10 tygodnia obserwacji stwierdzano procesy naprawcze z przewagą procesów regeneracyjnych prowadzących do wytworzenia tkanki chrzęstnej oraz mniej liczne procesy reparacyjne.

Podsumowanie

Przeprowadzone badania pilotażowe pozwoliły stwierdzić że zastosowane procedury operacyjne nie prowadziły do upośledzenia ruchowego zwierząt.

Podczas obserwacji pooperacyjnej, trwającej odpowiednio 8 oraz 10 tygodni, nie obserwowano objawów bólowych u operowanych królików.

Histologicznie stwierdzono obecność procesu chrzęstnienia na wszystkich możliwych podłożach z niewielkim udziałem procesów reparacyjnych.

Dla potwierdzenia uzyskanych wyników należałoby wydłużyć okres obserwacji na reprezentatywnej liczbie zwierząt oraz wykonać badania uzupełniające.

active osteoblasts. Condyle surface was covered with regenerating cartilage or fibrous tissue (FIG.5). In the adjacent bone numerous blood vessels were seen what were demonstrating the processes of reconstruction

After 10 weeks of observation the loss was showing a predominance of regenerative processes over repair processes which led to the generation of cartilage and smaller reparations processes.

Summary

Pilot studies allowed us to state that the used procedures do not lead to motor impairment of animals.

During the postoperative follow-up, lasting respectively 8 and 10 weeks, there were no symptoms of pain in the operated rabbits.

The presence of histologically cartilagecreating processes was noticed at all possible substrates with a minor contribution repairation processes.

To confirm the results is necessary to extend the period of observation of a representative number of animals and perform additional tests.

Piśmiennictwo

- [1]. Ciszek B. Morfologia i funkcja chrząstki stawowe. Acta Clinica 2010 Tom1, Numer1 10-14
- [2]. Malejczyk J. Budowa i immunologia tkanki chrzęstnej. Acta Clinica 2001 Tom 1, Numer 1 15-22
- [3]. Dziak A. Zespół przedwczesnego zużywania i zużycia chrząstki stawowej. Acta Clinica 2001 Tom 1, Numer 1 5-8
- [4]. Buckwalter JA. Articular cartilage: injuries and potencial for Halin. J Orthop Sports Phys Ther 1998 28:192-202
- [5]. Galle J, Bader A, Hepp P, Grill W, Fuchs B, Käs JA, Krinner A, Marquaß B, Müller K, Schiller J, Schulz RM, von Buttlar M, von der Burg E, Zscharnack M, Löffler M. Mesenchymal Stem Cells in Cartilage Repair: State of the Art and Methods to monitor Cell Growth, Differentiation and Cartilage Regeneration. Curr Med Chem. 2010 May [Epub ahead of print]

References

- [6]. Hunter W., Of structure and diseases of articular cartilages. Philosophical Transactions R Soc London B Biol Sci 1743, 9:267
- [7]. Redfern P. On the healing of wounds and auricular cartilage. Monthly Journal of Medical science 1851 1:201
- [8]. Hjertquist SO, Lemberg R: Histologic audiographic and microchemical studies with spontaneously healing osteochondral articular defects in adult rabbits. Calcium and Tissue Research 1971, 8:5
- [9]. Mitchell N, Shepard N: Resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations of the subchondral bone. J Bone Joint Surg Am 1976, 58:230
- [10]. Nehrer S, Vavken P, Dorotka R. Biomaterials in cartilage repair. ICRS 7th Worlds Congress Abstractbook : 111-112. Warsaw, 2007, www.cartilage.org

WYBRANE WŁASNOŚCI BIOMECHANICZNE PEEKOWEJ PROTEZY TRZONU TYPU „FUSION”

L.F.CIUPIK¹, A.KIERZKOWSKA^{1,2}, M.ŁOZOWSKI¹

¹ CENTRUM BADAWCZO-ROZWOJOWE,
INSTYTUT BIOINŻYNIERII MEDYCZNEJ, LfC,
UL. KOZUCHOWSKA 41, 65-364 ZIELONA GÓRA

² UNIwersYTET ZIELONOGÓRSKI,
INSTYTUT BUDOWY I EKSPLOATACJI MASZYN,
UL. PODGÓRNA 50, 65-246 ZIELONA GÓRA

*Słowa kluczowe: proteza trzonu, biomechanika,
badania modelowe, polimer, kręgosłup
[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 80-82]*

Wprowadzenie

Dysfunkcje przedniej kolumny kręgosłupa często wymagają usunięcia części lub całości uszkodzonych chorobowo: zwykle onkologicznie, osteoporoza [1,2] lub urazowo w wyniku urazu kompresyjnego, kompresyjno-fleksyjnego trzonów/trzonu [3]. W celu przywrócenia funkcji nośnych kręgosłupa, ubytki kostne wewnątrz trzonów, przy zachowaniu ciągłości tkanki zbitę wypełnia się najczęściej cementem kostnym [4,5] lub usuwa trzon/część trzonu i zastępuje międzytrzonowym stabilizatorem implantowym, protezą typu „fusion” [6,7,8].

Celem pracy była ocena wytrzymałościowa polimerowego modelu stabilizatora międzytrzonowego/protezy trzonu w próbie osiowego ściskania z wykorzystaniem badań numerycznych oraz empirycznych z weryfikacją uzyskanych wyników obydwu metod badawczych.

Materiały i metody

Do badań użyto modelu stabilizatora międzytrzonowego (patent), jednopozomowego wykonanego z implantowego polimeru typu PEEK Optima. Badania numeryczne (FEM) zrealizowano z wykorzystaniem pakietu obliczeniowego ANSYS. Testy polegały na wyznaczeniu maksymalnych naprężeń zredukowanych występujących w protezie podczas próby ściskania. Analiza uwzględniła nieliniowy model materiałowy. Założono warunki brzegowe z wymuszonym utwierdzeniem i przemieszczeniem. Na model została naniesiona siatka elementów skończonych typu tetragonalnego.

Badania doświadczalne, wytrzymałościowe przeprowadzono na maszynie MTS/MiniBionix zaopatrzonej w systemem wizyjny do oceny odkształceń i przemieszczeń powierzchniowych (RYS.1). Próbkę stanowiącą model implantu międzytrzonowego ściskano osiowo, aż o zniszczenia, a także poddawano obciążeniom cyklicznym realizowanym z często-

SELECTED BIOMECHANICAL PROPERTIES OF THE “FUSION” TYPE PEEK VERTEBRAL BODY PROSTHESIS

L.F.CIUPIK¹, A.KIERZKOWSKA^{1,2}, M.ŁOZOWSKI¹

¹ RESEARCH & DEVELOPMENT CENTER,
INSTITUTE OF BIOENGINEERING, LfC,
41 KOZUCHOWSKA STR. ZIELONA GÓRA

² UNIVERSITY OF ZIELONA GÓRA,
INSTITUTE OF MECHANICAL ENGINEERING AND MACHINE OPERATION,
50 PODGÓRNA STR., 65-246 ZIELONA GÓRA

*Key words: vertebral body prosthesis, modeling
research, polymer, spine
[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 80-82]*

Introduction

Anterior spinal column dysfunctions often require removal of a part or whole of the damaged: usually oncologically, by osteoporosis [1,2] or by trauma as a result of compressive, compressive/flexion injury vertebral body/bodies [3]. In order to restore the load-bearing functions of the spine, bony voids within vertebral bodies, while maintaining the continuity of the connective tissue, are usually filled with bone cement [4,5] or whole/part of the vertebral body is removed and replaced with interbody implant stabilizer, “fusion” type prosthesis.

Aim of the study was to evaluate strength of polymeric model of interbody stabilizer/vertebral body prosthesis in an attempt to axial compression, using numerical and empirical studied with verification of results obtained from both research methods.

Materials and methods

In the study was used a model of one-level interbody stabilizer (patent pending), made of implant polymer type PEEK Optima. Numerical investigations (FEM) were carried out using ANSYS software. The tests consisted in determining of equivalent stress occurring in the prosthesis during the compression tests. The analysis complies non-linear material model. Boundary conditions were assumed, with forced fixation and displacement. Finite model was mesh by using a tetragonal element type.

Strength experimental studies were carried out on the strength machine MTS/MiniBionix equipped with vision

system for evaluation of surface deformations and displacements (FIG.1). Samples representing interbody implant models were axially compressed, until the destruction, and subjected to cyclic loads realized with the frequency of 1 Hz, with number of cycles – 5 – from C₁ to C₅,



RYS.1. Stanowisko do badań biomechanicznych: a) kalibracja systemu wizyjnego na maszynie MTS; b) stabilizator międzytrzonowy podczas obciążeń cyklicznych

FIG.1. Working station for biomechanical tests: a) calibration of vision system on the strength machine MTS; b) intervertebral body stabilizer during cyclic loads

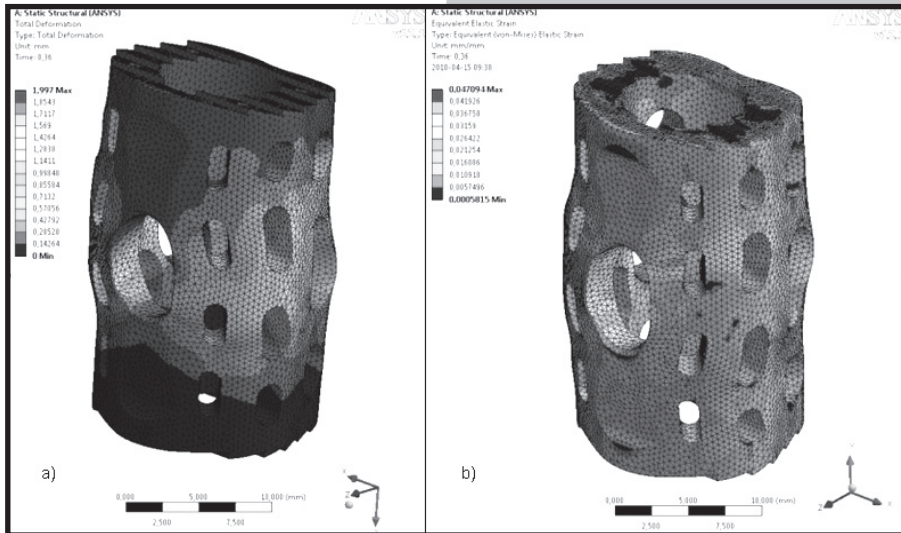
tiwością 1 Hz, przy liczbie cykli 5 - od C_1 do C_5 , kolejno dla przemieszczeń: $\Delta h=0.5, 1, 1.5, 2$ i 2.5 mm.

Wyniki

Wynikami badań numerycznych były mapy przemieszczeń całkowitych, naprężeń zredukowanych oraz odkształceń; przykłady przedstawiono na RYS.2. Granica plastyczności dla założonego modelu występuje przy przemieszczeniu na około $\Delta h=0.63$ mm i sile 4800 [N]. Przy przemieszczeniu do $\Delta h=2$ mm naprężenia wyniosły 165 MPa. Taka wartość według danych producenta odpowiada granicy wytrzymałości R_m polimeru PEEK Optima wykorzystanego w badaniach.

Wyniki badań w postaci sił: maksymalnej (F_{max}) i minimalnej (F_{min}) dla obciążeń cyklicznych przy przemieszczeniu $\Delta h=0.5, 1, 1.5, 2$ i 2.5 mm zestawiono w TABELI 1. F_{max} uzyskiwano podczas pierwszego cyklu obciążeń C_1 . W miarę zwiększania liczby cykli (od C_1 do C_5) siła malała i dla ostatniego cyklu C_5 w każdej z prób osiągała wartości najniższe F_{min} . Przy czym różnica $F_{max}-F_{min}$ w kolejnych próbach była coraz większa, co należy przypisywać wpływowi zmęczenia materiału przy zwiększających się przemieszczeniach. W badaniach niszczących, siła graniczna wyniosła 6206 N przy przemieszczeniu ok. 2.2 mm i była niższa od wartości uzyskanych podczas badań cyklicznych w próbach nr 4 i 5. Odkształcenia miały charakter plastyczny o kontrolowanym przebiegu. Największe deformacje były obserwowane w obszarach otworów przy ściśnięciu Δh 6-8% (RYS.3).

Zestawienie wartości sił w funkcji przemieszczenia dla badań doświadczalnych i modelowych uzyskanych z uży-



RYS.2. Przykłady obrazów z analiz FEM: a) całkowite przemieszczenie, b) odkształcenia
FIG.2. Examples of images from FEM analyses; a) total displacement, b) deformations

TABELA 1. Zestawienie sił: F_{max} oraz F_{min} dla poszczególnych prób badań cyklicznych

TABLE 1. Comparison of forces: F_{max} and F_{min} for particular trials of cyclic tests

Nr próby Trial No	Przemieszczenie cykliczne Cyclic displacement Δh [mm]	Siła max przy C_1 Max Force at C_1 F_{max} [N]	Siła min przy C_5 Min Force at C_5 F_{min} [N]	$F_{max}-F_{min}$ [N]
1	0.5	1315	1296	19
2	1	3750	3683	67
3	1.5	5775	5642	133
4	2	7143	6707	436
5	2.5	7357	5845	1512

in sequence for displacements: $\Delta h=0.5, 1, 1.5, 2$ and 2.5 mm.

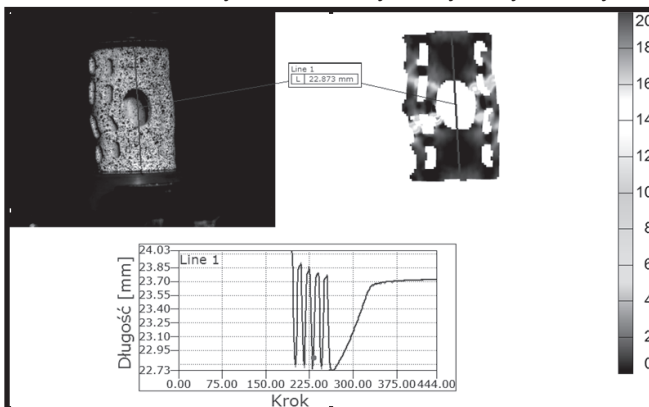
Results

Numerical tests results were the maps of total displacements, reduced strains and deformations; examples are presented in FIG.2. The yield strength for the assumed model occurs at the displacement of about $\Delta h=0.63$ mm and strength of 4800 [N]. At the

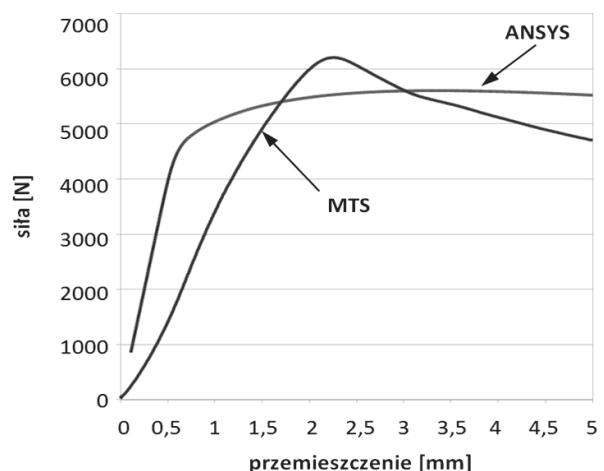
displacement up to $\Delta h=2$ mm strains were 165 MPa. Such a value according to the producer's data corresponds with the strength R_m of the polymer PEEK Optima used in these studies.

Tests results in a form of forces: maximum (F_{max}) and minimum (F_{min}) for cyclic loads at the displacement $\Delta h=0.5, 1, 1.5, 2$ and 2.5 mm were compared in TABLE 1.

F_{max} was obtained during the first cycle of loads C_1 . While increasing the number of cycles (from C_1 to C_2) the force decreased and for the last cycle C_5 in each of the samples obtained the lowest values of F_{min} . The difference $F_{max}-F_{min}$ in subsequent trials increased, which should be attributed to the impact of material fatigue at increasing displacements. In destructive tests, boundary

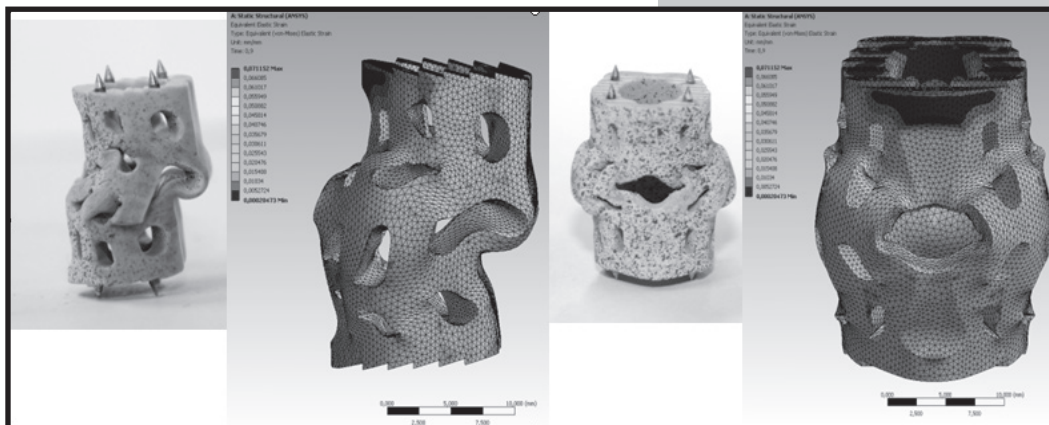


RYS.3. Przykłady wyników powierzchniowych odkształceń uzyskanych w systemie wizyjno-pomiarowym
FIG.3. Examples of incomes of surface deformations obtained in the vision-measurement system



RYS.4. Porównanie wyników badań numerycznych z użyciem programu (ANSYS) oraz doświadczalnych (MTS)

FIG.4. Comparison of numerical tests results using software (ANSYS) and experimental tests (MTS)



RYS.5. Przykłady zestawienia widoków próbek po ściskaniu z obrazami analiz komputerowych FEM

FIG.5. Example comparison of views of the samples after compression with images from computer analyses FEM

ciem ANSYS przedstawiono na RYS.4. Różnice uzyskanych rezultatów mogą wynikać z nieuwzględnionego zjawiska zmęczenia materiału, a także z rozbieżności w przyjętych do obliczeń wartości opisujących własności materiału modelowego i rzeczywistego.

Podsumowanie i wnioski

Odształcenia polimerowego modelu protezy trzonu podczas obciążeń charakteryzowały się kontrolowanym przebiegiem. Nie zaobserwowano oddzielania fragmentów konstrukcyjnych implantu. Największe deformacje były inicjowane w obszarach spodziewanych, najsłabszych – miejsca z otworami. Z przeprowadzonej analizy porównawczej wynika, że konstrukcja odznacza się znacznie większą wytrzymałością niż odpowiednie struktury kostne w miejscach, w których proteza jest stosowana i jest dostosowana do bezpiecznego przenoszenia obciążeń fizjologicznych.

W badaniach uzyskano daleko idącą odpowiedniość analiz komputerowych FEM z wynikami uzyskiwanymi w testach doświadczalnych (RYS.5). Metoda elementów skończonych FEM stanowi przydatne narzędzie poprzedzające i weryfikujące założenia do trudnych i kosztownych badań biomechanicznych.

Podziękowania

W pracy wykorzystano wyniki badań współfinansowanych ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, lata 2007-2013 (nr POIG.01.04.00-08-001/08-00).

Piśmiennictwo

- [1]. PF Heini, U Berlemann, M Kaufmann, K Lippuner, C Fankhauser, P van Landuyt. Augmentation of mechanical properties in osteoporotic vertebral bones-a biomechanical investigation of vertebroplasty efficacy with different bone cements. *Eur. Spine Journal* 10, 164-171, 2001.
- [2]. NB Watts, ST Harris, HK Genant. Treatment of painful osteoporotic vertebral fractures with percutaneous vertebroplasty or kyphoplasty. *Osteoporosis International* 12, 429-437, 2001.
- [3]. F Margel, M Aebi, SD Gertzbein, J Harms, S Nazarian. A comprehensive classification of thoracic and lumbar injuries. *Eur. Spine Journal* 3, 184-201, 1994.
- [4]. SM Belkoff, JM Mathis, LE Jasper, H. Deramond. The biomechanics of vertebroplasty. The effect of cement volume on mechanical behavior. *Spine* 26, 1537-1541, 2001.

force was 6206 N at the displacement about 2.2 mm and was lower than values obtained during cyclic tests in trials 4 and 5. Displacements had the plastic nature with a controlled course. The greatest deformations were observed in areas of holes at the compression Δh 6-8% (FIG.3).

The comparison of force values as the function of the displacement for experimental and modeling tests using ANSYS software is presented in FIG.4.

The differences of obtained outcomes can result from not considered fatigue of the material, and from divergences in values assumed for calculations, describing properties of the model and real material.

Summary and conclusions

Deformations of the polymeric model of the vertebral body prosthesis during the loading were characterized by a controlled course. No separation of construction fragments of the implant was observed. The greatest deformations were initialized in expected, the weakest areas – places with holes. The conducted comparative analysis shows, that the construction is characterized with much greater strength than corresponding bony structures in places, where the prosthesis is used and is suited for the safe transfer of physiological loads.

In the studies was obtained far-reaching suitability of computer FEM analysis with results obtained in experimental tests (FIG.5). Finite elements method FEM presents useful tool preceding and verifying assumptions for difficult and costly biomechanical tests.

Acknowledgements

In the paper were used results of studies subsidized by European Regional Development Fund within the Programme Innovative Technology, 2007-2013 (nr POIG.01.04.00-08-001/08-00).

References

- [5]. TH Lim, GT Brebach, SM Renner, et. al. Biomechanical evaluation of an injectable calcium phosphate cement for vertebroplasty. *Spine* 27, 1297-1302, 2002.
- [6]. E Ashkenazi. Anterior cervical decompression using the "Hybrid Decompression Fixation" technique, a combination of corpectomies and or discectomies, in the management of multilevel cervical myelopathy. *The Journal of Orthopaedics Trauma Surgery and Related Research* 4 (16), 50-54, 2009.
- [7]. LF Ciupik, A Kierzkowska, J Pieniążek, D. Zarzycki. The meaning of the vertebral endplate in the intervertebral stabilization. *Spondyloimplantology of advanced treatment of the spine using DERO system*. Zielona Góra, 55-65, 2005.
- [8]. SM Knöller, G Meyer, Ch Eckhardt, et. al. Range of motion in reconstruction situations following corpectomy in the lumbar spine. *Spine* 30 (9), E229-E235, 2005.

OCENA HISTOLOGICZNA I ULTRASTRUKTURALNA ŚCIAN TĘTNIAKÓW AORTY BRZUSZNEJ

MAGDALENA KOBIELARZ^{1,5}, KRZYSZTOF MAKSYMOWICZ^{2,5},
KATARZYNA KALETA³, PIOTR KUROPKA³, KRZYSZTOF MARYCZ⁴,
ROMUALD BĘDZIŃSKI^{1,5}

¹ZAKŁAD INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ I MECHANIKI EKSPERYMENTALNEJ, WYDZIAŁ MECHANICZNY, POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, WROCŁAW, POLSKA

²KATEDRA MEDYCYNY SĄDOWEJ, WYDZIAŁ LEKARSKI, AKADEMIA MEDYCZNA IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH, WROCŁAW, POLSKA

³KATEDRA ANATOMII I HISTOLOGII, WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ, UNIwersYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU, WROCŁAW, POLSKA

⁴PRACOWNIA MIKROSKOPII ELEKTRONOWEJ, WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ, UNIwersYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU, WROCŁAW, POLSKA

⁵WOJEWÓDZKI SZPITAL SPECJALISTYCZNY WE WROCŁAWIU, OŚRODEK BADAWCZO-ROZWOJOWY

Streszczenie

Rozwój tętniaków, w tym aorty brzusznej (AAA) jest dynamicznym procesem, który zachodzi w wyniku wieloczynnikowego, patologicznego remodelingu tkanki łącznej ściany aorty. Badania strukturalne ścian naczyń tętniczych (zdrowych i z tętniakiem) przeprowadzono w oparciu o analizę histologiczną i ultrastrukturalną. Analiza porównawcza wyników wykazała, że w przypadku preparatów ścian tętniaków aorty brzusznej odnotowano cały szereg zmian, które są charakterystyczne dla rozważanego schorzenia, w tym: wzmożony proces neowaskularyzacji oraz obecność nacieku zapalnego. Ponadto, odnotowano zatarcie granic między warstwami oraz redukcję ich grubości, co szczególnie zaznaczyło się w przypadku błony wewnętrznej. Zaobserwowano istotny ubytek włókien elastynowych oraz zmienny co do intensywności w poszczególnych przypadkach ubytek włókien kolagenowych. Wykazano także, że zmiany w liczbie włókien tkanki łącznej odgrywają kluczową rolę w procesie rozwoju AAA.

Słowa kluczowe: aorta brzuszna, tętniak, włókna elastynowe, włókna kolagenowe

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 83-87]

Wprowadzenie

Tętniak aorty brzusznej (AAA) to trwale i postępujące, lokalne poszerzenie aorty brzusznej o minimum 50% w stosunku do jej prawidłowej średnicy. AAA występuje głównie w podnerkowej części aorty brzusznej [1,2]. Tętniak aorty brzusznej powstaje w wyniku wieloczynnikowego, patologicznego remodelingu tkanki łącznej ściany aorty [3]. Przyczyna prowadząca do powstania tętniaka nie jest jeszcze znana. Potencjalnie, proces rozwoju AAA może być wywołany między innymi przez deficyt miedzi, cynku lub kwasu askorbinowego [4,5]. Wiele badań przeprowadzonych w ciągu ostatnich kilku lat wskazuje, że inicjację, rozwój oraz pęknięcie tętniaka powoduje degradacja białek strukturalnych ściany aorty, czyli elastyny i kolagenu [6-8], wywołana przez proteolityczne enzymy z rodziny endopeptydaz, głównie reprezentowane przez metaloproteiny macierzy pozakomórkowej (MMP) [1,9].

HISTOLOGICAL AND ULTRA-STRUCTURAL EVALUATION OF THE WALLS OF ABDOMINAL AORTIC ANEURYSMS

MAGDALENA KOBIELARZ^{1,5}, KRZYSZTOF MAKSYMOWICZ^{2,5},
KATARZYNA KALETA³, PIOTR KUROPKA³, KRZYSZTOF MARYCZ⁴,
ROMUALD BĘDZIŃSKI^{1,5}

¹DIVISION OF BIOMEDICAL ENGINEERING AND EXPERIMENTAL MECHANICS, INSTITUTE OF MACHINE DESIGN AND OPERATION, FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING, WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, POLAND

²DEPARTMENT OF FORENSIC MEDICINE, MEDICAL FACULTY, WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY, POLAND

³DEPARTMENT OF ANATOMY AND HISTOLOGY, FACULTY OF VETERINARY MEDICINE, WROCLAW UNIVERSITY OF ENVIRONMENTAL AND LIFE SCIENCE, POLAND

⁴ELECTRON MICROSCOPE LABORATORY, WROCLAW UNIVERSITY OF ENVIRONMENTAL AND LIFE SCIENCES, POLAND

⁵REGIONAL SPECIALIST HOSPITAL IN WROCLAW, RESEARCH AND DEVELOPMENT CENTRE, POLAND

Abstract

The development of abdominal aortic aneurysm (AAA) is a dynamic process proceeding as a result of the multi-factor pathological remodelling of the connective tissue. Structural investigations of normal and aneurysmal vessels were carried out on the basis of histological and ultrastructural examinations. A comparative analysis of the experimental results revealed a whole series of changes characteristic of the AAA walls (intensified neovascularisation and inflammatory infiltrations). In addition, the boundaries between the layers were found to be blurred and the thickness of the layers was reduced. A substantial loss of elastin fibres and a case-specific loss of collagen fibres were observed. The number of connective tissue fibres play a key role in the AAA development.

Key words: abdominal aorta, aneurysm, elastin fibres, collagen fibres

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 83-87]

Introduction

An abdominal aortic aneurysm (AAA) is a permanent and progressive dilatation (widening or bulge) of the abdominal aorta by at least 50% relative to its normal diameter. The AAA occurs mainly in the infrarenal part of the abdominal aorta [1, 2]. An abdominal aortic aneurysm arises as a result of the many-factor pathologic remodelling of the aorta's connective tissue [3]. The cause leading to an AAA is still unknown. Potentially, the development of an AAA can be induced by, among other things, copper, zinc or ascorbic acid deficiency [4, 5]. Many researches done in recent years indicate that the initiation, development and rupture of the aneurysm are caused by the degradation of the aortic wall structural proteins, i.e. elastin and collagen [6-8], induced by proteolytic enzymes from the endopeptidase family, represented mainly by matrix metalloproteinases (MMP) [1,9].

Material and methods

The experimental material had the form of 87 preparations of normal abdominal aortas (NAA) (average age of

Materiał badawczy stanowiły 87 preparatów ścian zmienionych patologicznie aort brzusznych (NAA) (średni wiek dawców: 66 ± 11 lat) oraz 96 preparatów ścian tętniaków aorty brzusznej (AAA) (średni wiek dawców: 68 ± 9 lat). Zgodę na przeprowadzenie badań oraz pozyskanie w tym celu materiału biologicznego wydała Komisja Bioetyczna przy Akademii Medycznej we Wrocławiu na podstawie decyzji nr KB-220/2010. Bezpośrednio po pobraniu, materiał biologiczny umieszczano w roztworze soli fizjologicznej i przechowywano w temperaturze 4°C .

donors: 66 ± 11 years) and 96 abdominal aorta aneurysm walls (AAA) (average age of donors: 68 ± 9 years). The permission to carry out the experiments and to acquire biological material for this purpose was granted by the Bioethical Committee at Wrocław Medical University on the basis of decision KB-220/2010. Immediately after it was taken, the biological material was placed in a physiologic salt solution and stored at a temperature of 4°C .

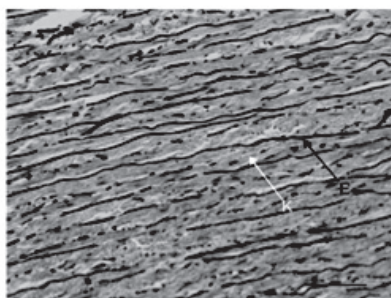
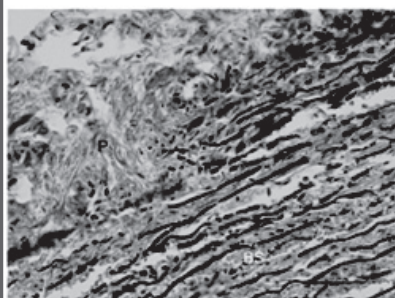
For the purpose of histological analysis, vascular wall segments 10mm^2 in area were fixed in a 4% solution of formalin for 48 hours, washed under running water, dehydrated in an alcohol series, cleared in methyl benzoate and xylene and

then embedded in paraffin. The cubes of experimental material were sliced in a Micron (Zeiss) microtome into $5\text{ }\mu\text{m}$ sections which were stained with haematoxylin and eosin according to Delafield, by the Azan-Novum method according to Geidies and by using Verhoff's method and Van Gieson's method to differentiate the collagen and elastin fibres in the connective tissue. The stained preparations were viewed under an Axiolmager M1m (Zeiss) microscope. Aortic wall fragments 10 mm^2 in area constituted the material for ultrastructural examinations. The experimental material was fixed in a 2,5% phosphate-buffered glutaraldehyde, dehydrated in an acetone series, then dried and stuck onto microscope stages, using carbon glue. For the purpose of ultrastructural analysis the previously dried material had to be sprayed with gold. The preparations were viewed under a Leo 435 VP (Zeiss) electron microscope and the image was recorded in high vacuum.

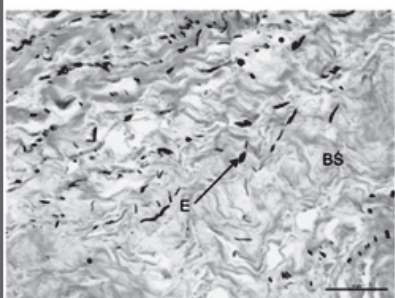
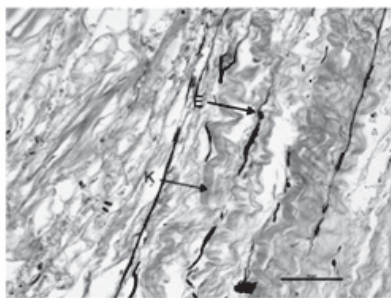
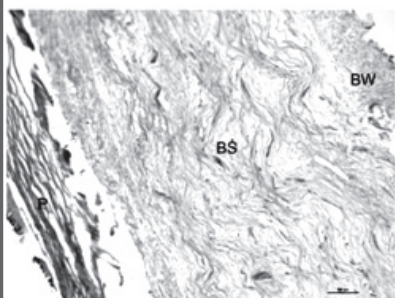
Results and discussion

No significant pathological changes were found in the histological images of the healthy abdominal aortic walls. All the layers were normally formed and no atrophy or significant structural disorders were observed in them (FIG.1a). Numerous elastin fibres (E) were present within the aortic media of the NAA walls (FIG.1a,b). The collagen fibres (K) observed in both the aortic media and the adventitia were morphologically normal (wavy) (FIG.1b). Numerous changes were discovered in the histological images of the abdominal aortic aneurysm walls. Disorders in the laminar structure were observed (FIG.1c). In most cases, the boundaries between the AAA wall layers had become blurred. Most of the aneurysms were found to lack a distinct intima layer. Single elastin fibres (E) randomly occurred in the full histological picture of the aneurysm walls (FIG.1d). In a few cases, elastin fibres fragmentation was observed (FIG.1e). The arrange-

Normal abdominal aorta



Abdominal aortic aneurysm



RYS.1. Obrazy histologiczne ścian zdrowych aort brzusznych (NAA) i ścian preparatów tętniaków aorty brzusznej (AAA): a) ściana zdrowej aorty brzusznej (P – przydanka; BS – błona środkowa) w barwieniu według Verhoff'a; b) włókna elastynowe (E) i kolagenowe (K) w obrazie histologicznym błony środkowej ściany NAA (barwienie według Verhoff'a); c) ściana tętniaka aorty brzusznej z rozróżnionymi warstwami (P – przydanka; BS – błona środkowa; BW – błona wewnętrzna); d) pojedyncze włókna elastynowe (E) w ścianie AAA (w barwieniu Van Gieson'a); e) fragmentacja włókien elastynowych (E) w błonie środkowej ściany AAA (w barwieniu techniką Van Gieson'a).
FIG.1. Histological images of normal abdominal aortic walls (NAA) and abdominal aortic aneurysm walls (AAA): a) Verhoff's stain of normal abdominal aortic wall (P – adventitia, BS – media), b) elastin (E) and collagen (K) fibres in histological image of NAA wall media (Verhoff's stain), c) abdominal aortic aneurysm wall with differentiated layers (P – adventitia, BS – media, BW – intima), d) single elastin fibre (E) in AAA wall (Van Gieson's stain), e) fragmentation of elastin fibres (E) in AAA wall media (Van Gieson's stain).

Analizy histologiczne przeprowadzono na wycinkach ścian naczyń o powierzchni 10 mm², które utrwalano w 4% roztworze formaliny przez 48 godzin, płukano w wodzie bieżącej, odwadniano w szeregu alkoholowym, prześwietlano w benzoesanie metylu i ksylenu, a następnie zatapiało w parafinie. Bloczki z materiałem badawczym krojono na mikrotomie Micron (Zeiss) na skrawki o grubości 5 μm, które barwiono: hematoksyliną i eozyną według Delafield'a oraz metodą Azan-Novum według Geidies'a oraz metodami Verhoff'a i Van Gieson'a, różnicującymi w tkance łącznej włókna kolagenowe i elastynowe. Zabarwione preparaty oglądano w mikroskopie świetlnym Axiolmager M1m (Zeiss). Materiał do badań ultrastrukturalnych stanowiły fragmenty ściany aorty o powierzchni 10 mm². Materiał badawczy utrwalono w 2,5 % roztworze aldehydu glutarowego na buforze fosforanowym, odwodniono w szeregu acetonowym, następnie suszono i naklejało na stoliki używając kleju węglowego. Analiza ultrastruktury wymagała napylenia złota na uprzednio wysuszony materiał. Preparaty oglądano w skaningowym mikroskopie elektronowym Leo 435 VP (Zeiss), a powstały obraz rejestrowano w warunkach wysokiej próżni.

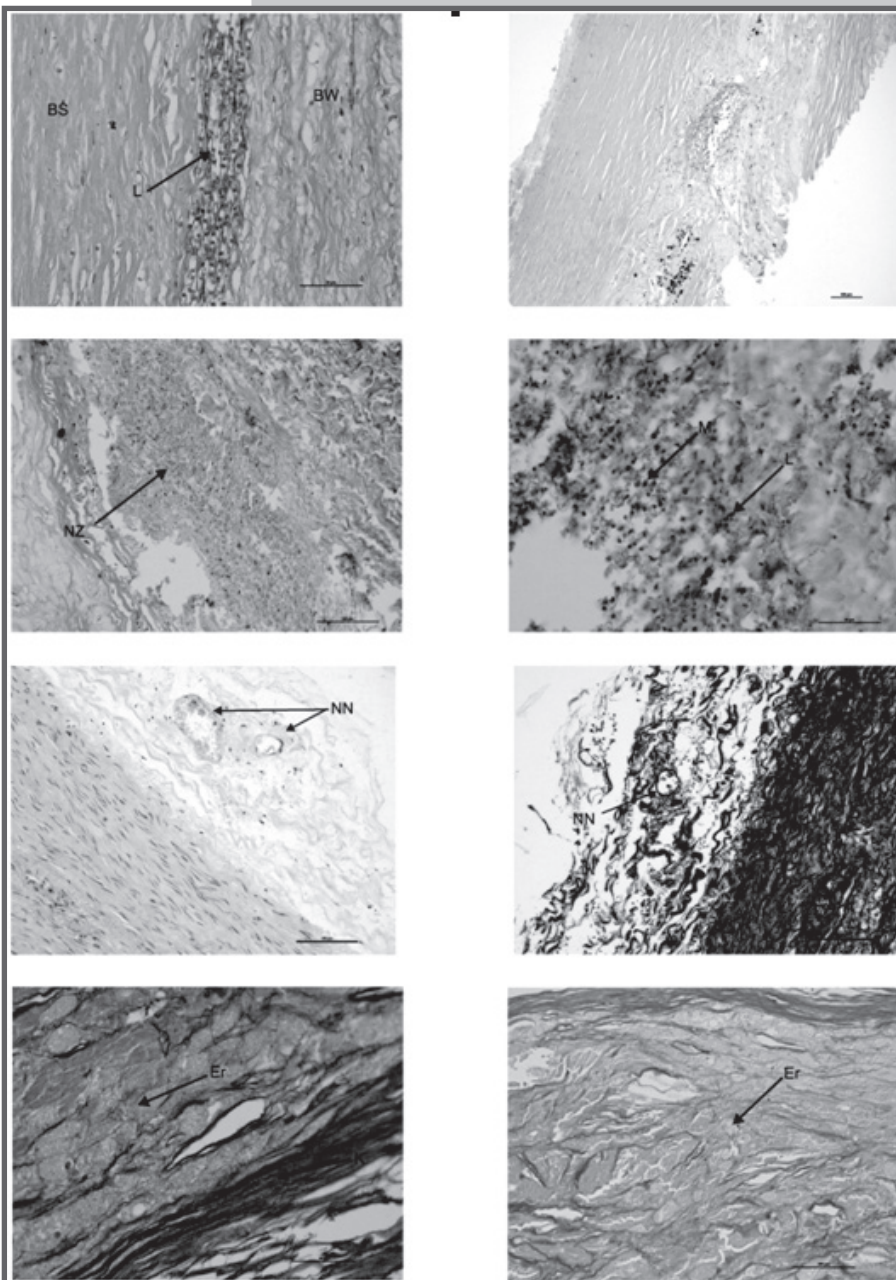
Wyniki i dyskusja

W obrazach histologicznych preparatów zdrowych ścian aort brzusznych nie odnotowano istotnych zmian patologicznych. Wszystkie warstwy ukształtowane były prawidłowo i nie obserwowano ich zaniku ani innych istotnych zaburzeń w ich budowie (RYS.1a). W obrębie błony środkowej preparatów ścian NAA obserwowano licznie występujące włókna elastynowe (E) (RYS.1a,b). Włókna kolagenowe (K), obserwowane zarówno w błonie środkowej, jak i przydancie, miały poprawny morfologicznie, pofalowany przebieg (RYS.1b). W obrazach histologicznych preparatów ścian tętniaków aorty brzusznej odnotowano liczne zmiany. Obserwowano zaburzenia w budowie warstwowej (RYS.1c). W większości przypadków doszło do zatarcia granic między warstwami ścian AAA. Większość ścian tętniaków jest pozbawiona rozpoznawalnej warstwy wewnętrznej. W pełnym obrazie histologicznym preparatów uzyskanych ze ścian tętniaków występowały losowo pojedyncze włókna elastynowe (E) (RYS.1d). W nielicznych przypadkach obserwowano również fragmentację włókien elastynowych (RYS.1e). Układ włókien kolagenowych w preparatach ścian AAA w błonie środkowej naczyń był zaburzony (RYS.1d,e,f).

W obrazach histologicznych prepa-

ment of collagen fibres in the media of the AAA walls was disordered (FIG.1d,e,f).

Inflammatory infiltrations, located on the boundary



RYS.2. Obrazy preparatów ścian tętniaków aorty brzusznej: a) naciek zapalny umiejscowiony na granicy między błoną środkową (BS) i wewnętrzną (BW) (w barwieniu techniką H&E) b) naciek zapalny w sąsiedztwie złogów wapnia (w barwieniu techniką H&E) c) rozległy naciek zapalny (NZ) (w barwieniu: Azan-Novum) d) naciek zapalny z rozróżnialnymi makrofagami (M) oraz limfocytami (L) (w barwieniu techniką H&E) e) naczynia naczyń (NN) w barwieniu H&E; f) naczynia naczyń (NN) w barwieniu Verhoff'a; g) przesącz osocza i składników morfotycznych krwi (Er – erytrocyty) do wnętrza ściany naczynia w barwieniu Verhoff'a oraz h) przesącz osocza i składników morfotycznych krwi (Er – erytrocyty) do wnętrza ściany naczynia w barwieniu Azan-Novum.

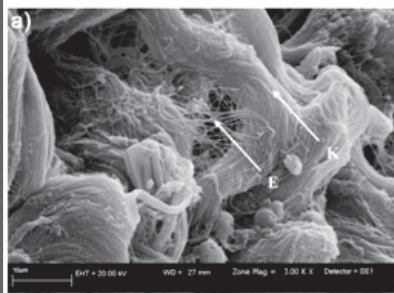
FIG.2. Images of abdominal aortic aneurysm walls: a) inflammatory infiltration located on boundary between media (BS) and intima (BW) (H&E stain), b) inflammatory infiltration in vicinity of calcium deposits (H&E stain), c) extensive inflammatory infiltration (NZ) (Azan-Novum stain), d) inflammatory infiltration with discernible macrophages (M) and lymphocytes (L) (H&E stain), e) vasa vasorum (NN) (H&E stain), f) vasa vasorum (NN) (Verhoff's stain), g) infiltration of blood plasma and morphotactic blood components (Er – erythrocytes) into vascular wall (Verhoff's stain) and h) infiltration of blood plasma and morphotactic blood components (Er – erythrocytes) into vascular wall (Azan-Novum stain)

ratów ścian tętniaków aorty brzusznej obserwowano obecność nacieków zapalnych, które umiejscawiały się na granicy między błoną środkową (BŚ) i wewnętrzną (BW) (RYS.2a), ewentualnie w sąsiedztwie złogów wapnia oraz całkowicie ukształtowanych blaszek miażdżycowych (rys. 2. b). Nacieki zapalne złożone były w przeważającej części z limfocytów oraz makrofagów (RYS.2d). Obserwowano także wzmożony proces neowaskularyzacji ścian tętniaków (RYS.2e,f). Naczynia naczyni (vasa vasorum) występowały zarówno w przydanie, co jest cechą fizjologiczną, jak również w warstwie środkowej ścian tętniaków aorty brzusznej, co jest zdecydowanie patologią. Nieliczne przypadki preparatów ścian tętniaków wykazywały cechy pęknięcia. W tych preparatach zaobserwowano we wnętrzu ściany naczynia obecność osocza, a nawet składników morfotycznych krwi (RYS.2g,h). Przesącz osocza do wnętrza ściany wywoływał rozsuniecie się włókien kolagenowych i powstanie przestrzeni, które wypełniał tworzący się skrzep (RYS.2h).

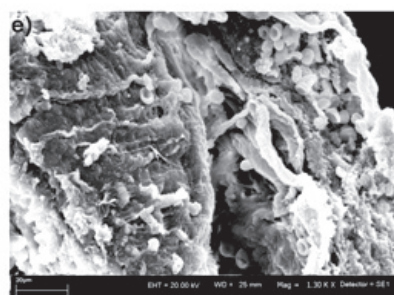
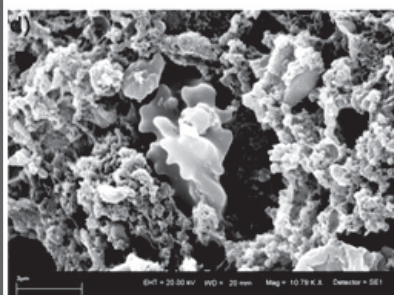
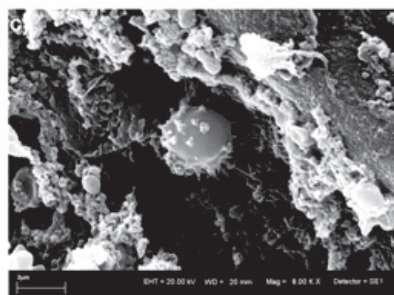
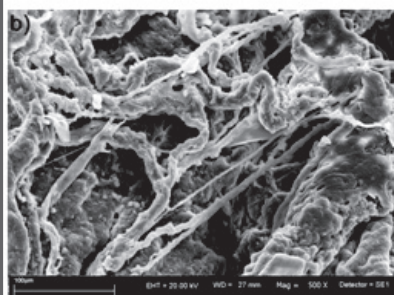
W obrazach preparatów ścian zdrowych aort brzusznych

w skaningowym mikroskopie elektronowym obserwowano charakterystyczne, poprawne morfologicznie ułożenie włókien, które tworzą trójwymiarową sieć (RYS.3a). W zdecydowanej większości preparatów ścian NAA obserwowano występowanie blaszek miażdżycowych lub złogów wapnia, zlokalizowanych na granicy między błoną wewnętrzną a środkową. Obrazy SEM ścian tętniaków aort brzusznych wykazały, że przebieg włókien kolagenowych w przydanie był zaburzony i w większości analizowanych przypadków układ włókien kolagenowych miał charakter wyprostny (zbliżony do liniowego) (RYS.3b). Obserwowano również występowanie komórek nacieku zapalnego – odnotowano obecność limfocytów w ścianach tętniaków aorty brzusznej (RYS.3c). W przypadkach, w których zauważono cechy pęknięcia ściany tętniaka rejestrowano występowanie

Normal abdominal aorta



Abdominal aortic aneurysm



RYS.3. Obrazy SEM ścian zdrowych aort brzusznych (NAA) i tętniaków aort brzusznych (AAA): a) włókna elastynowe (E) i kolagenowe (K) w błonie środkowej ściany NAA; b) wyprostny przebieg włókien kolagenowych w przydanie ściany AAA; c) limfocyt (L) widoczny w ścianie AAA; d) rozpadający się i degradujący erytrocyt (Er); e) krwaki objęty przez elementy łącznotkankowe (Er – erythrocyty).

FIG.3. SEM images of walls of normal abdominal aortas (NAA) and abdominal aortic aneurysms (AAA): a) elastin (E) and collagen (K) fibres in NAA wall media; b) straight-linear shape of collagen fibres in adventitia of AAA wall; c) lymphocyte (L) visible in AAA wall; d) disintegrating and degrading erythrocyte (Er); e) thrombus enveloped by connective tissue elements (Er – erythrocytes).

between the media (BS) and the intima (BW) (FIG.2a) or in the vicinity of calcium deposits or fully formed atheromatous plaques (FIG.2b), were observed in the histological images of the abdominal aortic aneurysm walls. The inflammatory infiltrations consisted mainly of lymphocytes and macrophages (FIG.2d). Also intensified neovascularization of the aneurysm walls was observed (FIG.2e,f). Vasa vasorum occurred in both the adventitia (which is normal) and the abdominal aortic aneurysm wall media (which is clearly pathological). Only in a few cases, the aortic aneurysm walls showed rupture symptoms. In such preparations blood plasma, and even morphotic blood components, were found to be present inside the vascular

wall (FIG.2g,h). The infiltration of blood plasma into the wall resulted in the separation of collagen fibres and the creation of a space which would be filled with a forming thrombus (FIG.2h).

The characteristic morphologically normal arrangement of fibres (forming a three-dimensional network) was observed in SEM images of the normal abdominal aortic walls (FIG. 3a). Atheromatous plaques (or at least calcium deposits), located on the boundary between the intima and the media, were found in most of the NAA walls. SEM images of the abdominal aortic aneurysm walls showed that the shape of collagen fibres in the adventitia was disordered and in most of the examined cases it was almost straight-linear (FIG.3b). Also inflammatory infiltration cells (lymphocytes in the walls of the abdominal aortic aneurysms) were found

elementów morfotycznych, które degradując w ścianie naczynia otaczane są przez łącznotkankowe komponenty strukturalne, co nadaje ścianie naczynia specyficzny wygląd przypominający obszar nekrozy (RYS.3d,e).

W procesie rozwoju tętniaka dochodzi do ubytku włókien elastynowych oraz kolagenowych, przy czym ubytek włókien elastynowych jest pierwszym zjawiskiem obserwowanym w procesie rozwoju AAA, natomiast znamienne zmniejszenie liczby włókien kolagenowych, które początkowo przejmują funkcje włókien elastynowych w procesie przenoszenia obciążeń, zachodzi dopiero w końcowym etapie rozwoju tętniaka. Potwierdza to wcześniej wysuniętą tezę, że ubytek włókien elastynowych w ścianie tętniaka aorty brzusznej związany jest głównie z rozwojem tętniaka, natomiast przerwanie ciągłości ściany tętniaka odnoszone jest do procesu degradacji włókien kolagenowych [10-13]. Degradacja włókien elastynowych i kolagenowych może być związana z procesami zapalnymi [7,14]. Badania histologiczne ścian tętniaków wykazały istnienie rozległych nacieków zapalnych w większości analizowanych przypadków, co potwierdziły także obserwacje innych autorów [15]. Przyczyna powstawania procesu zapalnego nie jest znana. Możliwe, że jest to wynik reakcji autoimmunologicznej lub odpowiedź na działania różnego typu czynników zapalnych lub zakaźnych, jak np.: *Chlamydia pneumoniae* [16]. Komórki zapalne w warstwie środkowej i przydane mogą pochodzić bezpośrednio z krwi, która dostarczana jest do ściany przez nowo powstające naczynia naczyn, w wyniku wzmoczonego procesu neowaskularyzacji [1].

Podziękowania

Pracę zrealizowano w ramach projektu: „WROVASC- Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo - Naczyniowej”, finansowanego w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego oraz z budżetu państwa - Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka 2007-2013.

to be present (FIG.3c). In the cases when symptoms of aneurysm wall rupture were noticed, morphotic elements occurred which as they degrade are enveloped by structural connective tissue components whereby the vascular wall acquires a characteristic appearance resembling a necrotic area (FIG.3d,e).

As the AAA develops, the number of elastin and collagen fibres decreases. First the loss of elastin fibres is observed while a reduction in the number of collagen fibres, which initially take over the load bearing functions of the elastin fibres, takes place only in the final stage in the development of the AAA. This corroborates the thesis proposed earlier that the loss of elastin fibres in the AAA wall is connected mainly with the development of the aneurysm while the breaking of AAA wall continuity is linked with the degradation of collagen fibres [10-13]. The degradation of elastin and collagen fibres may be linked with the inflammatory process [7,14]. Our histological examinations of the walls of aneurysms revealed extensive inflammatory infiltrations in most of the cases, which other authors observations corroborated [15]. The cause of the inflammatory process is unknown. It could be the result of an immune response or a response to various inflammatory or infectious agents, e.g. *Chlamydia pneumoniae* [16]. The inflammatory cells in the media and in the adventitia may come directly from the blood which is supplied to the wall by the newly forming (as a result of intensified neovascularization) vessels of the vessels (vasa vasorum) [1].

Acknowledgements

This work is supported by European Regional Development Fund and the Polish Government (Operational Programme - Innovative Economy) under the grant "WROVASC – Integrated Cardiovascular Centre" which is being realized in years 2007-2013.

Piśmiennictwo

- [1]. Sakalihan, N., R. Limet, and O. Defawe, Abdominal aortic aneurysm. *Lancet*, 2005; 365: 1577-89.
- [2]. Li, Z. and C. Kleinstreuer, Analysis of biomechanical factors affecting stent-graft migration in an abdominal aortic aneurysm model. *J Biomech*, 2006; 39: 2264-2273.
- [3]. Davies, M., Aortic aneurysm formation: lessons from human studies and experimental models. *Circulation*, 1998; 98: 193-195.
- [4]. Cooggon, D., C. Martyn, and C. Osmond, Mortality from aortic aneurysms in migrants between countries of England and Wales: evidence for causes acting early in life. *QJM*, 1997; 90: 133-137.
- [5]. Rucker, R., T. Kosonen, M. Clegg, A. Mitchell, B. Rucker, J. Uriu-Hare, and C. Keen, Copper, lysyl oxidase, and extracellular matrix protein cross-linking. *Am J Clin Nutr*, 1998; Suppl 67: 996-1002.
- [6]. Longo, M., S. Buda, N. Fiotta, W. Xiong, T. Griener, S. Shapiro, and T. Baxter, MMP-12 has a role in abdominal aortic aneurysms in mice. *Surgery*, 2005; 137: 457-462.
- [7]. Brady, A., S. Thompson, G. Fowkes, R. Greenhalgh, and J. Powell, Abdominal aortic aneurysm expansion. Risk factors and time intervals for surveillance. *Circulation*, 2004; 110: 16-21.
- [8]. Eriksson, P., K. Jones, L. Brown, R. Greenhalgh, A. Hamsten, and J. Powell, Genetic approach to the role of cysteine proteases in the expansion of abdominal aortic aneurysms. *Brit J Surg*, 2004; 91: 86-89.

References

- [9]. Thompson, R. and T. Baxter, MMP Inhibition in abdominal aortic aneurysms rationale for a prospective randomized clinical trial. *Ann NY Acad Sci*, 1999; 878: 159-178.
- [10]. Chang, M. and M. Roach, The composition and mechanical properties of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*, 1994; 20: 6-13.
- [11]. Dobrin, P. and R. Mrkvicka, Failure of elastin or collagen as possible critical connective tissue alterations underlying aneurysmal dilatation. *Cardiovascular Surgery*, 1994; 2: 484-488.
- [12]. Wills, A., M. Thompson, M. Crowther, R. Sayers, and P. Bell, Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms - cellular and biochemical mechanisms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 1996; 12: 391-400.
- [13]. Damme, H., N. Sakalihan, and R. Limet, Factors promoting rupture of abdominal aortic aneurysms. *Acta Chir Belg*, 2005; 105: 1-11.
- [14]. Thompson, M. and G. Cockerill, Matrix Metalloproteinase-2 the forgotten enzyme in aneurysm pathogenesis. *Ann NY Acad Sci*, 2006; 1085: 170-174.
- [15]. Bobryshev, Y., R. Lord, and H. Parsson, Immunophenotypic analysis of the aortic aneurysm wall suggests that vascular dendritic cells are involved in immune responses. *Cardiovasc Surg*, 1998; 6: 240-249.
- [16]. Wassef, M., G. Upchurch, H. Kuivaniemi, and R. Thompson, Challenges and opportunities in abdominal aortic aneurysm research. *J Vasc Surg*, 2007; 45: 192-198.

INTELLIGENTNE OPATRUNKI NA TRUDNO GOJĄCE SIĘ RANY

ANNA PŁANECKA^{1*}, ALINA SIONKOWSKA¹,
BARTŁOMIEJ PIETRZAK², WITOLD SUJKA³

¹UNIwersytet Mikołaja Kopernika,
KATEDRA CHEMII I FOTOchemii POLIMERÓW,
ZESPÓŁ BIOPOLIMERÓW,
UL. GAGARINA 7, 87-100 TORUŃ, POLSKA

²MATOPAT SP. Z O.O.

UL. ŻÓŁKIEWSKIEGO 20/26 87-100 TORUŃ, POLSKA

³TRICOMED S.A.

UL. ŚWIĘTOJAŃSKA 5/9 93-493 ŁÓDŹ, POLSKA

*MAILTO: ANNAP@CHEM.UMK.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 88-90]

Wprowadzenie

Oparzenie jest stanem wymagającym natychmiastowej interwencji i mobilizacji wszystkich środków ratowniczych i finansowych dostępnych w szpitalu, jest stanem bezpośredniego zagrożenia życia. Rumień, pęcherze, obrzęki, martwica, owrzodzenia to różne objawy oparzeń skóry. Niektóre z nich wymagają leczenia szpitalnego, a czasami nawet zabiegów przeszczepiania skóry. Mówiąc o oparzeniach skóry, mamy najczęściej na myśli skutki działania wysokiej temperatury, czyli tzw. oparzenia termiczne. Jednak oparzenia mogą być także wywołane energią elektryczną, substancjami chemicznymi, promieniowaniem jonizującym, słonecznym, laserowym oraz rażeniem piorunem.

Oparzenia, w zależności od ich głębokości, dzielimy na trzy stopnie. Oparzenie I stopnia obejmuje wyłącznie naskórek. Objawy polegają jedynie na wystąpieniu rumienia i obrzęku. Wyleczenie następuje po kilku dniach. Oparzenie II stopnia dotyczy także części skóry. Objawia się ono w postaci pęcherzy, obrzęku i częściowej martwicy naskórka. Oparzenia te są bolesne, występuje w nich przeczulica na dotyk i ruch powietrza. Przydatki skórne, chodzi tu głównie o mieszki włosowe, są nieuszkodzone, co jest bardzo istotne, gdyż gojenie się tych oparzeń polega na pokrywaniu się ran naskórkiem powstającym z podziałów komórek naskórkowych tychże mieszków. Oparzenie III stopnia obejmuje już całą grubość skóry i niszczy przydatki skóry. Rany są zwęglone, woskowate, barwy białej lub szarawej. Zwykle są też suche. Oparzone powierzchnie są niebolesne, nie reagują na dotyk lub uklucie. Wyleczenie tego typu oparzeń jest już tylko częściowe, na skórze pozostają różnie rozległe i głębokie blizny. Oparzenia I lub II stopnia nazywamy też oparzeniami lekkimi. Obejmują one 1-2% powierzchni ciała. Są to zwykle oparzenia domowe wywołane gorącym lub wrzącym płynem [1,2].

Inżynieria tkankowa umożliwia zastosowanie pierwotnych hodowli keratynocytów naskórka do leczenia oparzeń i owrzodzeń. Metoda ta jest jednak czasochłonna, trudna i bardzo kosztowna. Wyhodowanie pseudonaskórka pokrywającego 1% powierzchni ciała kosztuje około 10000 \$ [3].

Poszukuje się nowych rozwiązań i coraz lepszych materiałów, które mogłyby pomóc w zabliźnianiu ran pooparzeniowych.

INTELLIGENT DRESSINGS ON CHRONIC WOUNDS

ANNA PŁANECKA^{1*}, ALINA SIONKOWSKA¹,
BARTŁOMIEJ PIETRZAK², WITOLD SUJKA³

¹NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY,
CHAIR OF CHEMISTRY AND PHOTOCHEMISTRY OF POLYMERS,
GROUP OF BIOPOLYMERS,

7 GAGARINA STREET, 87-100 TORUN, POLAND

²MATOPAT LTD

20/26 ŻÓŁKIEWSKIEGO STREET, 87-100 TORUN, POLAND

³TRICOMED S.A.

5/9 ŚWIĘTOJAŃSKA STREET, 93-493 ŁÓDŹ, POLAND

*MAILTO: ANNAP@CHEM.UMK.PL

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 91-93]

Introduction

Burn is a condition that requires immediate intervention and emergency mobilization of all resources and funding available in the hospital, it is a state of imminent threat to life.

Erythema, blisters, swelling, necrosis, ulcers are different symptoms of skin burns. Some of these symptoms require hospitalization, and sometimes even skin grafting treatments. When we consider of skin burns, we usually mean the effects of high temperatures, ie. thermal burns. However, burns may also be caused by electricity, chemicals, ionizing radiation, solar, laser and lightning shocks.

Burns, depending on their depth, are divided into three steps. First degree of burn involves only the epidermis. Symptoms depend only on the occurrence of erythema and edema. Recover is usually after a few days. Second degree of burn also applies to parts of the skin. It manifests itself in the form of blistering, swelling, and partial skin necrosis. These burns are painful, they have hyperesthesia to touch and air movement. Skin appendages, just a matter of hair follicles are undamaged, which is very important, since the healing of these burns is the epidermis covering the wounds arising from the division of epithelial cells of these follicles. Third degree burn longer includes the entire thickness of the skin and destroys the skin appendages. Wounds are charred, waxy, white or greyish. They are usually very dry. Burnt surfaces are painless, do not respond to touch or sting. The treatment for this type of burn is only partial, on the skin appear broad and deep scars. Both, I or II degree of burns are usually called light. They include 1-2% of body surface area. These kind of burns are usually caused by domestic accidents with boiling and/or hot liquid.

Tissue engineering enables the use of primary epidermal keratinocyte cultures for the treatment of burns and ulcers. This method, however, is time-consuming, difficult and very expensive. Culturing pseudoepidermis covering 1% of body surface area costs about \$ 10,000.

New and better solutions and materials that could help to cure wounds are sought by material scientists and medical doctors.

Materiały i metody

W pracy zbada-
dano materiały
opatrunkowe na
bazie alginianu
wapnia oraz opa-
trunki hydrokolo-
idowe, pozyskane
dzięki uprzejmości
Toruńskich Zakła-
dów opatrunko-
wych w Toruniu
(RYS.1,2).

Opatrunek
na bazie alginianu
wapnia jest ste-
rylnym opatrunkiem przezna-
czonym do stosowania bezpo-
średnio na ranę. Włókna tego
opatrunku reagują z wydzieloną
raną tworząc delikatny, wilgot-
ny żel, który stwarza warunki
sprzyjające gojeniu. Żel do-
datkowo chroni przed urazami
mogącymi wystąpić ze strony
opatrunku zewnętrznego i mi-
nimalizuje ryzyko powstania
urazu podczas zmiany opatrunk-
u. Opatrunek ten umożliwia
wymianę gazową, nie pozwala
na wyciek wydzieliny na obszar
zdrowej skóry zapobiegając
jej maceracji. Żel, który przy
zmianie opatrunku pozostaje w
ranie daje się łatwo wypłukać
przy pomocy 0,9% roztworu soli
fizjologicznej.

Opatrunek hydrokoloidowy
jest opatrunkiem złożonym nie
tylko z warstwy hydrokoloidowej
ale także z cienkiej pianki poliuretanowej. Opatrunek ten,
także umożliwia migrację tlenu i pary wodnej oraz jedno-
cześnie nie przepuszcza bakterii. W kontakcie warstwy
hydrokoloidowej z wydzieloną z rany powstaje spójny żel,
który dzięki odpowiedniej wilgotności sprzyja gojeniu się
rany. Utworzony żel nie przylega do rany przez co nowo
utworzona tkanka nie jest narażona na uraz podczas
usuwania bądź zmiany opatrunku. Lekko kwaśny odczyn
wytworzony pod opatrunkiem likwiduje ryzyko infekcji przy-
spieszając ziarninowanie. Opatrunek ten doskonale nadaje
się do leczenia owrzodzeń podudzi. Przyspiesza proces
oczyszczania i ziarninowania rany dzięki utrzymywaniu
wilgotnego środowiska. Jego zaletą jest również zminima-
lizowanie bolesności zmiany opatrunku.

W pracy zbadano właściwości mechaniczne (odporność
na zerwanie) na sucho oraz w roztworze soli fizjologicznej.
Badania prowadzono za pomocą maszyny wytrzyma-
łościowej Zwick&Roell ze specjalną komorą do badań w
roztworze (RYS.3).

Zbadano również stopień spęcznienia opatrunków w
buforze fosforanowym, w 37°C, imitując warunki organizmu
pacjenta. W podobnym środowisku określono czas degra-
dacji opatrunków.



RYS.1. Opatrunek na bazie alginianu wapnia
FIG.1. Dressing based on calcium alginate



RYS.2. Opatrunek hydrokoloidowy
FIG.2. Hydrocolloid dressings



**RYS.3. Ma-
szyna wytrzy-
małościowa
Zwick&Roell ze
specjalną ko-
morą do badań
w roztworze**
**FIG.3. Test-
ing machine
Zick&Roell
with a special
chamber for
testing in so-
lution**

bandage designed for use di-
rectly on the wound. Fibers that
react with discharge dressing
the wound to form soft, moist gel
which creates favorable condi-
tions to healing. The gel also
protects against injuries that might
occur outside of the dressing, and
minimizes the risk of injury when
changing the dressing. The dress-
ing allows gas penetration, it does
not allow the runny area of healthy
skin and prevents maceration.
The gel, which is a deposit after a
changing of the wound dressing
can be easily rinsed with 0.9%
saline solution.

Hydrocolloid dressing is not
only a bandage made of a layer
of hydrocolloid but it is also made
of a thin polyurethane foam. This
dressing also allows migration of
oxygen and water vapor, and at
the same time does not allow to
pass the bacteria. The contact layer of hydrocolloids with
wound secretion is able to create a consistent gel, which,
thanks to an appropriate humidity promotes wound healing.
Created gel does not stick to the wound for a newly formed
tissue and it is not exposed to trauma during the removal
or alteration of the dressing. Slightly acidic environment
produced under the dressing eliminates the risk of infection
by the acceleration of granulation. The dressing is perfectly
suited for the treatment of leg ulcers. The above dressing
accelerates the process of purification and granulation
wounds by keeping of the moisture in the wound environ-
ment. The advantage of such dressing is the minimization
of the painful dressing replacements.

In this study we investigated the mechanical properties
of dressing (resistance to breaking) in dry conditions and in
saline solution. The study was performed using the testing
machine Zwick&Roell with a special chamber to test the
material in solution (FIG.3).

We also measured the degree of swelling of dressings
in phosphate buffer in 37°C, simulating the conditions of
the patient's body. The degradation of dressings has been
studied at the same environment i.e. in phosphate buffer
in 37°C.

Materials and methods

In this study we
investigated the
dressing materials
based on calcium
alginate and hy-
drocolloid dress-
ings, obtained by
courtesy of Torun
Group of Dress-
ings (FIG.1,2).

Dressing based
on calcium algi-
nate is a sterile

Wyniki i dyskusja

Wyniki wykazały dobrą odporność na zerwanie nie tylko na sucho ale i w roztworze, odpowiedni stopień spęcznienia dla opatrunków oraz długi okres degradacji materiałów. Zapewnia to badanym opatrunkom odpowiednie właściwości użytkowe.

Podziękowania

Autorzy dziękują Toruńskim Zakładom Materiałów opatrunkowych, MATOPAT, Sp.z o.o. za udostępnienie materiałów do badań.

Results and conclusions

The results showed good resistance of dressing to breaking in both, dry state and in the solution. Moreover, a sufficient degree of swelling for a long period of dressings and materials degradation have been observed. The results proved that the dressings provide suitable properties for application in burn treatment.

Acknowledgments

The authors thank the company Toruńskie Zakłady Materiałów Opatrunkowych, so-called MATOPAT Sp. z o.o. for the support of the study.

Piśmiennictwo

- [1] Małgorzata Lech, Żyjmy dłużej, Warszawa 2000.
- [2] Basil A. Pruitt, Albert T. McManus, Seung H. Kim, Cleon W. Goodwin, World J. Surg, 135–145, 1998.

References

- [3] red. Tomasz Drewna „Wybrane zagadnienia z medycyny regeneracyjnej i inżynierii tkankowej: podręcznik do seminariów dla studentów kierunku Biotechnologia”, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń 2007.

ODPORNOŚĆ FOTOCHEMICZNA CHITOZANU W OBECNOŚCI DODATKÓW: KOLAGENU, GLUTATIONU, KAMFOROCHINONU, FENYLOALANINY ORAZ TYROZINY

ALINA SIONKOWSKA, ANNA PŁANECKA*, JUSTYNA KOZŁOWSKA, PAULINA ŁOŚ, JOANNA SKOPIŃSKA-WIŚNIEWSKA

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA, WYDZIAŁ CHEMII, KATEDRA CHEMII I FOTOCHEMII POLIMERÓW, ZESPÓŁ BIOPOLIMERÓW, UL. GAGARINA 7, 87-100 TORUŃ, POLSKA
*MAILTO: ANNAP@CHEM.UMK.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 90-92]

Wprowadzenie

Chitozan jest produktem N-deacetylacji chityny, polimeru należącego do grupy polisacharydów pochodzenia głównie zwierzęcego. Jego nazwa systematyczna to poli[β-(1,4)-2-amino-2-deoxy-D-glukopiranoza]. Jest to kopolimer składający się z komonomerów N-acetyloglukozy tj. 2-acetamido-2-deoxy-β-D-glukopiranozy i 2-amino-2-deoxy-β-glukopiranozy.

W przeciwieństwie do chityny, chitozan ze względu na rozpuszczalność w wodnych roztworach kwasów, zwłaszcza organicznych, zaliczany jest do polimerów o wyraźnym charakterze użytkowym. Chitozan wykazuje szereg korzystnych cech takich jak biodegradowalność, bioaktywność, biogodność, wysoka adhezja, nietoksyczność, zdolność do chelatowania i wiązania jonów metali i substancji organicznych, błono- i włóknotwórczość [1,2]. Chitozan tak jak każdy biomateriał musi być przed użyciem sterylizowany.

PHOTOCHEMICAL STABILITY OF CHITOSAN IN THE PRESENCE OF SMALL AMOUNT OF COLLAGEN, GLUTATHIONE, CAMPHOROQUINONE, PHENYLALANINE AND TYROSINE

ALINA SIONKOWSKA, ANNA PŁANECKA*, JUSTYNA KOZŁOWSKA, PAULINA ŁOŚ, JOANNA SKOPIŃSKA-WIŚNIEWSKA

NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY, FACULTY OF CHEMISTRY, CHAIR OF CHEMISTRY AND PHOTOCHEMISTRY OF POLYMERS, GROUP OF BIOPOLYMERS, 7 GAGARINA STREET, 87-100 TORUN, POLAND
*MAILTO: ANNAP@CHEM.UMK.PL

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 90-92]

Introduction

Chitosan is a product of N-deacetylation of chitin, a polymer belonging to the group of polysaccharides. In chemical nomenclature chitosan is called poly[β-(1,4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranoses]. Chitosan as a copolymer consists of N-acetylglucose co-monomers, which is 2-acetylaminoglycose-2-deoxy-β-D-glucosepyranoses and 2-amino-2-deoxy-β-glucosepyranoses.

Chitosan due to the solubility in aqueous solutions of organic acids is widely applied in many fields, whereas the application of insoluble chitin is limited. Chitosan has several great features such as biodegradability, bioactivity, biocompatibility, high adhesion, non-toxicity, the ability to chelate and bind metal ions and organic substances, membrane and the fiber formation [1,2].

Like other biomaterials chitosan has to be sterilized prior the application. Germicidal lamp emitting ultraviolet radia-

Bakteriobójcza lampą emitującą promieniowanie nadfioletowe jest często stosowanym środkiem do sterylizacji materiałów medycznych. Dlatego zasadne jest poznanie przemian zachodzących w chitozanie pod wpływem działania promieniowania UV oraz modyfikacja chitozanu w celu podniesienia jego fotochemicznej odporności. Oprócz zastosowania chitozanu przy wytwarzaniu wyrobów medycznych, farmaceutycznych i w biotechnologii, jest także stosowany do oczyszczania wody, w kosmetyce, rolnictwie, dodatkach do żywności, w przemyśle włókienniczym oraz produkcji błon. W świetle tak dużego zastosowania chitozanu ważne jest, aby odpowiednio chronić go przed działaniem promieniowania UV. Przebieg procesu fotostarzenia i fotodegradacji polimerów można modyfikować dodając do nich niewielkie ilości innych substancji. Mogą to być substancje małocząsteczkowe, bądź wielocząsteczkowe. W zależności od budowy chemicznej mogą one hamować, bądź przyspieszyć procesy fotochemiczne w polimerach. W pracy zbadano mieszaniny chitozanu z niewielkimi dodatkami (1% i 0,1%) kolagenu, glutationu, kamforochinonu, fenyloalaniny oraz tyrozyny.

Materiały i metodyka

Chitozan (Aldrich Sigma) użyty do badań charakteryzował się stopniem deacetylacji 91,22 oraz średnim ciężarem cząsteczkowym 760000 g/mol. Kolagen otrzymano ze ścięgien ogonów młodych szczurów – albinosów. Po wypłukaniu ścięgien w wodzie destylowanej, rozpuszczono je w 0,1M kwasie octowym. Glutation i kamforochinon oraz rozpuszczalnik kwas octowy zakupiono z firmy Aldrich Sigma. Natomiast Fenyloalanina i tyrozyna z firmy Fluka. Przygotowano próbki o następującym składzie procentowym: chitozan/kolagen – 99/1; chitozan/glutation – 99,9/0,1; chitozan/kamforochinon – 99,9/0,1; chitozan/fenyloalanina – 99,9/0,1; chitozan/tyrozyna – 99,9/0,1.

Do napromieniania próbek użyto średniociśnieniową lampę rtęciową HPR-120 W (firmy Philips, Holandia) emitującą promieniowanie UV o długości fali 254 nm. Zmierzone natężenie wynosiło 0,1542 J/(s²·m) (25,7 W/m²).

Próbki nie naświetlane i poddane działaniu promieniowania scharakteryzowano za pomocą spektroskopii w podczerwieni (po wcześniejszym wylewaniu roztworów czystego chitozanu, oraz jego mieszanin z różnymi dodatkami modyfikującymi na płytki wykonane z CaF₂ i odparowaniu rozpuszczalnika) oraz wykonano widma w świetle UV-Vis (w spektrofotometrze badano cienkie błonki polimerowe, uzyskane przez wylewanie roztworów polimerów bezpośrednio na płytki z kwarcu optycznego).

Wyniki i dyskusja

Na RYSUNKU 1 pokazano zmianę absorbancji w zakresie widm UV-Vis przy długości fali 320 nm w zależności od czasu naświetlania promieniowaniem UV o długości fali 254 nm.

Analizując wyniki spektroskopii w świetle widzialnym i UV można zauważyć, że absorbancja chitozanu i jego mieszanin rośnie w trakcie naświetlania. Najwyższą wartość absorbancji osiągnęły mieszaniny chitozanu z dodatkiem kamforochinonu oraz tyrozyny. Oznacza to, że właśnie te dwa dodatki najbardziej przyspieszają reakcje fotochemiczne w chitozanie. Również glutation przyspiesza reakcje fotochemiczne w chitozanie, ponieważ związek ten dzięki grupom chromoforowym pochłania dodatkową porcję energii i tworzy rodniki, które inicjują kolejne przemiany fotochemiczne w chitozanie. Także w obecności fenyloalaniny efektywność tworzenia grup chromoforowych jest większa, niż dla czy-

tion is a frequently used means of sterilization of medical materials. Therefore it is reasonable to know how the action of UV radiation modifies the chitosan and to find chemical compounds which enhance its photochemical stability. Chitosan is also used in the manufacture of medical devices, pharmaceuticals and in biotechnology as well as in water treatment. The ability of film formation is widely applied in cosmetics, agriculture and in the textile industry. Such wide application of chitosan requires the protection of this biopolymer against UV radiation. The process of photoaging and photo-degradation of polymers can be modified by addition small amounts of other substances. Depending on the chemical structure, they may inhibit or accelerate the photochemical processes in polymers. In this study we focused on photochemical stability of chitosan in the presence of small additions (1% and 0.1%) of collagen, glutathione, camphoroquinone, phenylalanine and tyrosine.

Materials and methods

Chitosan (Sigma Aldrich) used for the study was marked by a degree of deacetylation of 91.22 and the average molecular weight 760,000 g / mol. Collagen was obtained from tail tendons of young rats - albino. After washing in distilled water the tendons were dissolved in 0.1 M acetic acid. Glutathione and camphoroquinone and solvent - acetic acid were purchased from Sigma Aldrich, whereas phenylalanine and tyrosine from Fluka company.

Samples have been prepared with the following percentage composition: chitosan / collagen - 99 / 1; chitosan / glutathione - 99.9 / 0.1, chitosan / camphoroquinone - 99.9 / 0.1, chitosan / phenylalanine - 99.9 / 0.1; chitosan / tyrosine - 99.9 / 0.1.

Irradiation of the samples was carried out using mercury lamp Medium HPR-120 W (Philips, Holland) emitting UV light with a wavelength of 254 nm. The measured intensity was 0.1542 J / (s²·m) (25.7 W/m²). Samples not irradiated, and after UV-treatment were characterized by infrared spectroscopy (after pouring the solutions of pure chitosan and its mixtures with various additives onto CaF₂ plates and evaporation of the solvent thin film was formed), and by UV-Vis spectroscopy (in the spectrophotometer has been studied thin polymer film, obtained by pouring the polymer solutions directly on the plate of optical quartz).

Results and discussion

FIGURE 1 shows the change in absorbance in the UV-Vis spectra of chitosan at a wavelength of 320 nm, depending on time of UV irradiation with a wavelength of 254 nm. From the results of spectroscopy in the visible light and UV it can be seen that the absorbance of chitosan and its blends increases during irradiation. Maximum value was reached for chitosan with the addition of tyrosine and camphoroquinone. It suggests that these two compounds accelerate photochemical reactions in the chitosan. Glutathione also accelerates the photochemical reactions of chitosan, because of chromophoric groups of glutathione consume an additional portion of energy and produce radicals, which initiate further photochemical transformation of chitosan. Also in the presence of phenylalanine chromophoric groups efficiency is bigger than for pure chitosan.

FIGURE 2 shows the dependence of integral intensity of the carbonyl band in FTIR spectrum of chitosan with time of UV-irradiation. After short of irradiation we observe the decrease of the amount of carbonyl group for both, pure chitosan and chitosan with additives. After long time of irradiation we observe an increase of amount of carbonyl

stego chitozanu.

Na RYSUNKU 2 pokazano zależność zmian intensywności integralnej pasma karbonylowego w widmie FTIR od czasu napromieniania lampą rtęciową, emitującą promieniowanie UV o długości fali 254 nm.

Zarówno w czystym chitozanie, jak i w obecności dodatków substancji modyfikujących po napromienianiu, grup karbonylowych najpierw ubywa, potem przybywa i ponownie ubywa. Na podstawie analizy wyników spektroskopii IR (a dokładniej pól powierzchni charakterystycznych pasm) wnioskujemy, że w filmach chitozanowych z różnymi dodatkami ubywa wody związanej, ale także grup $C=O$ i $-NH$. Ilość grup $=CH_2$ nie ulega większym zmianom. Natomiast z wartości położenia pasm drgań pochodzących od charakterystycznych grup (prezentowanych na posterze) wynika, że procesy fotoutleniania zachodzą w przypadku naświetlania filmów chitozanowych z dodatkiem fenyloalaniny i tyrozyny.

Wnioski

W obecności fenyloalaniny i tyrozyny procesy fotoutleniania w chitozanie zachodzą z większą wydajnością. Również glutation i kamforochinon przyspieszają procesy fotochemiczne w chitozanie. Zdegradowany fotochemicznie chitozan posiada mniejszą masę cząsteczkową, a co za tym idzie lepszą rozpuszczalność, co może być wykorzystane w produkcji kosmetyków i biomateriałów o bardziej hydrofilowych właściwościach.

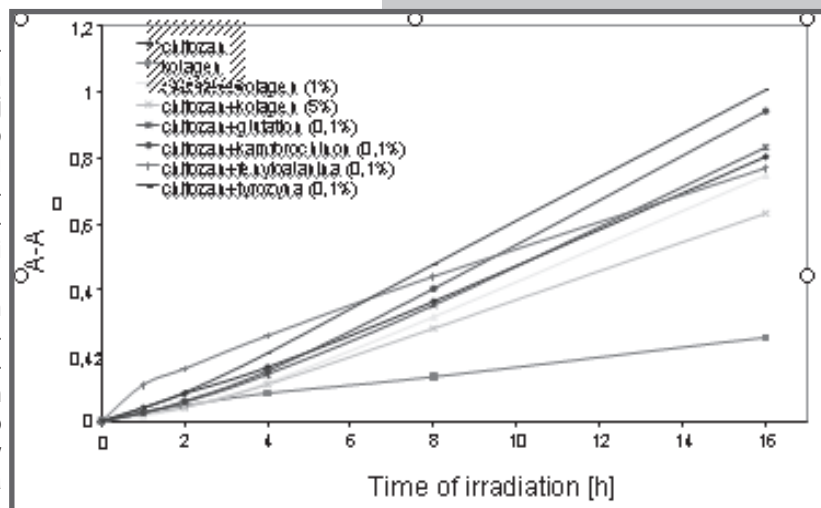
Podziękowania

Autorzy dziękują JM Rektorowi UMK za wsparcie finansowe w ramach grantu 501-CH.

Piśmiennictwo

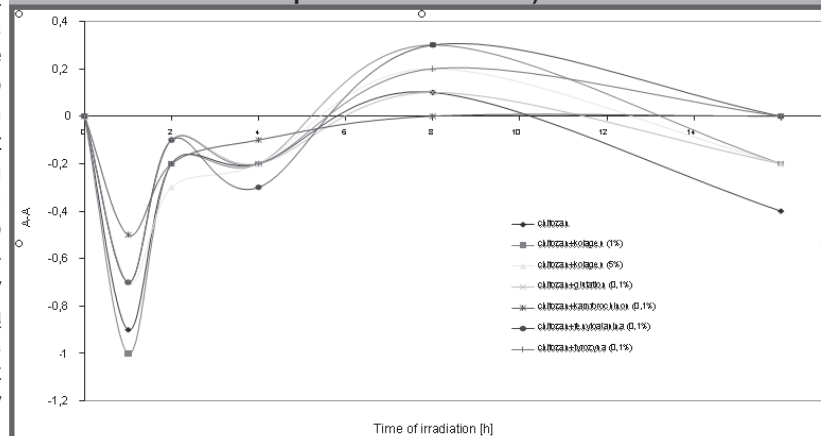
[1] N.V. Majeti, R. Kumar, *Reactive & Functional Polymers* (2000) 46: 1–27.

[2] L. G. Engibaryan, A. I. Chernukhina, G. A. Gabrielyan, L. S. Gal'braikh, *Fibre Chemistry*, (2005) 37: 285 – 288.



RYS.1. Zmiany absorbancji przy długości fali 320 nm w funkcji czasu naświetlania (A- absorbancja próbki po napromienianiu, A0- absorbancja próbki nienapromienianej)

FIG.1. Changes in absorbance at a wavelength of 320 nm as a function of exposure time (A-absorbance of the sample after irradiation, A0-absorbance of the sample before irradiation)



RYS.2. Zmiany intensywności integralnej pasma karbonylowego (w zakresie 1520-1800 cm⁻¹) w funkcji czasu naświetlania (A- absorbancja próbki po napromienianiu, A0- absorbancja próbki nienapromienianej) lampą rtęciową.

FIG.2. Changes in carbonyl band integral intensity (in the range 1520-1800 cm⁻¹) as a function of exposure time (A-absorbance of the sample after irradiation, the absorbance of the samples before irradiation - A0)

groups. Based on the analysis of the FTIR results (namely the area of characteristic bands), we can conclude that in the films of chitosan photooxidation processes occur.

However, the location of the vibration bands in FTIR spectrum originating from specific groups suggests that photooxidation processes occur more efficiently in the case of irradiation of chitosan films with the addition of phenylalanine and tyrosine.

Conclusion

The chitosan photooxidation processes occur with greater efficiency in the presence of phenylalanine and tyrosine. Glutathione and camphorquinone also accelerate photochemical processes in chitosan. Photochemically degraded chitosan has a lower molecular weight, and thus better

solubility, which can be used in cosmetics formulations as well as in preparation of more hydrophilic biomaterials.

Acknowledgements

The authors thank JM NCU Rector for financial support under the grant 501-CH.

References

WPLYW PARAMETRÓW PROCESU PACVD NA BUDOWĘ I WŁAŚCIWOŚCI SYNERGICZNYCH UKŁADÓW $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})/\text{Ti}$

JADWIGA KONEFAŁ^{1*}, ANNA MAŁEK¹, STANISŁAWA KLUSKA¹,
STANISŁAWA JONAS¹, SŁAWOMIR ZIMOWSKI²

¹AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA IM. STANISŁAWA STASZICA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

²AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA IM. STANISŁAWA STASZICA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MECHANICZNEJ I ROBOTYKI,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

*MAILTO: KONEFAŁ@AGH.EDU.PL

Streszczenie

Modyfikacja powierzchni tytanu i jego stopów, poprzez nanoszenie warstw technikami plazmowymi, uważana jest za jeden z najbardziej efektywnych i skutecznych sposobów poprawy ich parametrów użytkowych. W tej pracy przedstawiamy wyniki badań nad otrzymywaniem warstw węglazotku krzemu $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$ na podłożu Ti Grade 2 metodą chemicznego osadzania z fazy gazowej ze wspomaganie plazmy generowanej mikrofalami (MWCVD, 2,45 GHz, 2 kW). Warstwy o różnej zawartości Si, C i N osadzano przy użyciu reaktywnych mieszanin gazowych o odpowiednio dobranym stężeniu składników: SiH_4 , CH_4 , NH_3 . Otrzymane materiały poddano analizie składu i budowy atomowej z zastosowaniem technik SEM/EDS i FTIR. Oceny użytkowych właściwości synergicznych układów „warstwa – podłoże” dokonano w badaniach właściwości tribologicznych.

Słowa kluczowe: technologia PACVD, biomateriały tytanowe, warstwy $\alpha\text{-SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$
[Inżynieria Biomateriałów, 99-101,(2010),93-97]

Wprowadzenie

Tytan ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne zaliczany jest do grupy najbardziej obiecujących biomateriałów. Dzięki dobrej wytrzymałości mechanicznej, obojętności chemicznej i wysokiej odporności na korozję, a także dzięki dobrej zgodności tkankowej oraz niskiej toksyczności, nawet przy długich okresach inkubacji w żywym organizmie, stanowi on atrakcyjny materiał dla implantologii [1,2]. Pierwsze udokumentowane próby zastosowania tytanu w chirurgii kostnej przypadają na lata '40 ubiegłego stulecia [3]. Od tamtego czasu nastąpił znaczący postęp w kierunku modyfikacji czystego tytanu, umożliwiającej poprawę jego relatywnie niskich parametrów tribologicznych, przy zachowaniu dobrych właściwości biologicznych. Efekty takie uzyskano poprzez wprowadzenie do struktury Ti różnych pierwiastków, jak: Al, V, Nb, Mo, W, Co, Si, Ta, Zr oraz Fe [1,2,4,5].

Aktualne kierunki badań nad możliwościami modyfikacji biomateriałów tytanowych mają na celu wyeliminowanie problemu alergii, pojawiającej się w międzywarstwie implant – kość i ograniczenie zjawiska metalozy, skutkującej przejściem szkodliwych pierwiastków do organizmu ludzkiego. Prowadzone badania mają również na celu poprawę tribologicznych właściwości materiałów tytanowych. W tym celu wykorzystuje się różne techniki modyfikacji powierzchni tak, aby przy zachowaniu walorów tytanu, poprawić właściwości,

INFLUENCE OF PACVD PARAMETERS ON STRUCTURE AND PROPERTIES OF SYNERGIC $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})/\text{Ti}$ SYSTEM

JADWIGA KONEFAŁ^{1*}, ANNA MAŁEK¹, STANISŁAWA KLUSKA¹,
STANISŁAWA JONAS¹, SŁAWOMIR ZIMOWSKI²

¹AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
30 MICKIEWICZA AVE., 30-059 CRACOW, POLAND

²AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING AND ROBOTICS,
30 MICKIEWICZA AVE., 30-059 CRACOW, POLAND

*MAILTO: KONEFAŁ@AGH.EDU.PL

Abstract

Operational parameters of titanium biomaterials may be effectively improved by application of layers of given chemical composition deposited with application of plasma techniques. This work reports the results concerning formation of $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$ layers on Ti Grade 2 substrate. The layers were formed in plasma assisted chemical vapor deposition (PACVD system) with application of microwave (MW) plasma (MWCVD technique, 2,45 GHz, 2 kW). The layers of various Si, C and contents were obtained from reactive gas mixture of SiH_4 , CH_4 , NH_3 at various ratios. The samples were subjected to chemical composition studies with SEM-EDS technique. FTIR spectra were used in the description of atomic structure of the layers. Operational properties of synergic layer-substrate systems were evaluated in the measurements of tribological parameters.

Keywords: PACVD, titanium biomaterials, $\alpha\text{-SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$ layers
[Engineering of Biomaterials, 99-101,(2010),93-97]

Introduction

Titanium, due to its specific physical and chemical properties, belongs to a family of the most important biomaterials. Thanks to good mechanical properties, chemical inertness, high corrosion resistance as well as good tissue compatibility and low toxicity, even during long period of incubation in a biological environment, is considered as a very attractive materials for implantology [1,2]. First reported efforts to use titanium in bone surgery comes from the forties of the previous century [3]. Since then, very strong progress has occurred which allowed improving relatively pure tribological properties of titanium with simultaneous preservation of its biological properties. This was achieved by introducing various elements, such like: Al, V, Nb, Mo, As, Co, Si, Ta, Zr, Fe and others into Ti [1,2,4,5]. Current trends in modification of titanium biomaterials are aimed at eliminating a danger of an allergy at the implant - bone interface and at reducing metalosis in the vicinity of metal implants - the result of corrosion or hypersensitivity reaction. Further improvement of tribological properties of titanium is another important purpose of the studies.

The most effective techniques to modify Ti include surface engineering methods. Plasma assisted chemical vapor deposition (PACVD) is considered as one of the most reliable one. It allows modifying the operational parameters of any material via formation a well adhesive layer of tailored chemi-

które nie spełniają norm, stawianych biomateriałom do konkretnych zastosowań. Jedną ze stosowanych technik jest chemiczne osadzanie warstw z fazy gazowej, aktywowane plazmowo (PACVD – Plasma Assisted Chemical Vapour Deposition), pozwalające na modyfikację powierzchni materiału poprzez osadzenie warstwy o odpowiednio dobranym składzie chemicznym [6]. Aktualnie, najczęściej stosowane są amorficzne warstwy diamentopodobne a-C:H. Jednak ze względu na ich niską adhezję do podłoża wciąż poszukuje się nowych, lepszych rozwiązań.

W tej pracy przedstawiamy nowy kierunek badań, jakim jest modyfikacja powierzchni tytanu poprzez stosowanie warstw węglazotku krzemu $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$, o różnej względnej zawartości poszczególnych pierwiastków (w tym warstwy SiC_x i Si_xN_y), osadzanych na powierzchni Ti metodą PACVD.

Technologia warstw i metody badań

Warstwy typu $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$, $x \geq 0$, $y \geq 0$, otrzymano metodą chemicznego osadzania z fazy gazowej z użyciem plazmy mikrofalowej (MWCVD 2,45 GHz, 2 kW) na podłożach Ti Grade 2 i (001)Si. Podłoża wstępnie oczyszczono przy użyciu alkoholu izopropylowego oraz acetonu. Właściwe osadzanie poprzedzono trawieniem jonowym w plazmie argonowej (przepływ gazu 225 sccm), prowadzonym przez 10 minut, przy ciśnieniu 0,3 Tr, moc 400 W.

Warstwy formowano z zastosowaniem mieszaniny gazów reakcyjnych, zawierającej SiH_4 , NH_3 i CH_4 w różnych proporcjach - TABELA 1. Przepływ silanu i argonu był utrzymywany na niezmiennym poziomie. Parametrem zmienianym w kolejnych seriach był iloraz stężeń $[\text{NH}_3]/[\text{CH}_4]$, przy stałej sumie przepływów tych gazów. W ten sposób otrzymano pięć serii próbek, każda o innej zawartości krzemu, węgla, azotu i wodoru. Czas osadzania wynosił 30 minut, ciśnienie w komorze reakcyjnej 0,3 Tr, temperatura podłoża 600°C, moc 400 W.

Zmodyfikowane powierzchniowo materiały metaliczne zostały poddane badaniom składu chemicznego przy użyciu mikroskopu skaningowego JOEL, Model 5400 z mikroanalizatorem dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego EDS. W opisie budowy atomowej warstw wykorzystano widma FTIR, zarejestrowane przy użyciu spektrofotometru Bio-Rad FTS 60 V (256 skanów, rozdzielczość 4 cm^{-1}).

Dodatkowo przeprowadzono badania tribologiczne, celem wyznaczenia współczynników tarcia i zużycia w ruchu obrotowym. Badania wykonano z godnie z normami ASTM

Serial/ Series	Warstwa/ Layer	Przepływ gazów / Gas flow [sccm]			
		Ar	NH_3	CH_4	SiH_4
1	Si_xN_y	225	150	--	3
2	$\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$	225	140	10	3
3	$\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$	225	135	15	3
4	$\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$	225	130	20	3
5	SiC	225	--	25	3

TABELA 1. Skład gazowych mieszanin reakcyjnych, zastosowanych w formowaniu warstw $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$ w układzie PACVD.

TABLE 1. The composition of gas mixtures applied in plasma assisted CVD of $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$ layers.

cal composition [6]. Amorphous diamond-like carbon layers (a-C:H) belong to the best known and most commonly used layer materials. Unfortun-

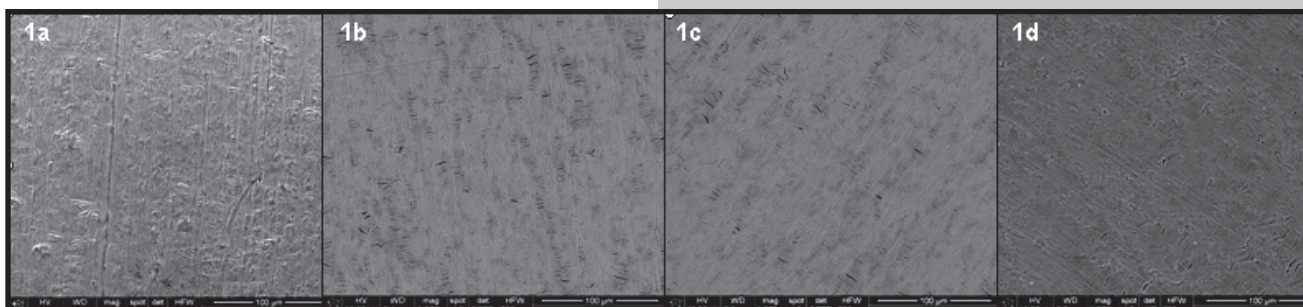
nately a presence of residual stresses in the layers of this type lower their adhesion to the substrate.

In this work a new direction of research is presented which is the modification of Ti with $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$ layers of various content of Si, C and N (including SiC and Si_xN_y layers).

Materials and methods

The series of $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$, $x \geq 0$, $y \geq 0$ layers were obtained by chemical vapor deposition using microwave plasma (MWCVD 2,45 GHz, 2 kW) on Ti Grade 2 and (001) Si. The substrates were pre-cleaned with isopropyl alcohol and acetone. The formation of the layers was preceded by ion etching in argon plasma (gas flow 225 sccm), during 10 minutes, under 0,3 Tr of the pressure, the power 400 W. The layers were deposited with application of the reactive gas mixture containing SiH_4 , NH_3 i CH_4 at various ratios – TABLES 1. Silane and argon flows were kept at unchanged level. The $[\text{NH}_3]/[\text{CH}_4]$ ratio was varied in the respective experiments, while the sum of the flows of these gases was constant. In this way five series of the samples were obtained – each one of various silicon, carbon, nitrogen and hydrogen contents. In each case the processing time was 30 minutes. The other parameters were as follows: pressure in reaction chamber - 0,3 Tr, the substrate temperature - 600°C, MW plasma generator power - 400 W.

The samples with the layers were subjected to the studies of chemical composition with application of SEM/EDS technique (SEM JOEL, Model 5400 with energy dispersive X-ray microprobe). In the description of the atomic structure of the layers the FTIR spectra registered with Bio-Rad FTS 60 V spectrophotometer were used (256 scans, resolution 4 cm^{-1}). The friction and wear coefficients were measured using "sphere - shield" type tribotester, in accordance with ASTM standards G 99-05, ISO 20808:2004. The tribological parameters of the synergic systems (the substrate with the layer) were compared with the respective parameters of the unmodified titanium sample.



RYS.1. Obraz SEM czystego Ti (RYS. a) oraz obrazy SEM Ti z warstwą: b) Ti z warstwą Si_xN_y , c) Ti z warstwą $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$ - seria 4, d) Ti z warstwą SiC_x .

FIG.1. SEM image of unmodified Ti surface and SEM images of Ti with the layer: b) Ti with Si_xN_y layer, c) Ti with $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$ layer, d) Ti with SiC_x layer

G 99 - 05, ISO 20808:2004, za pomocą tribotestera typu kula – tarcza.

Wyniki

Na RYSUNKU 1 zestawiono obrazy SEM warstw $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$, SiC_x , Si_3N_5 osadzonych na podłożu Ti z obrazem powierzchni tytanu przed modyfikacją. Przedstawione obrazy nie wykazują istotnych różnic. Są one typowe dla amorficznych bądź też mikrokryształicznych warstw.

W TABELI 2 podano ilościowe zależności, charakteryzujące skład chemiczny otrzymanych warstw i oszacowane z widm EDS. Zgodnie z oczekiwaniami, próbka pierwszej serii zawiera wyłącznie azot i krzem oraz tytan pochodzący od podłoża (a także wodór, którego widmo EDS nie rejestruje). Stosunek $[\text{N}]/[\text{Si}]$ w tej warstwie wynosi około 1,7 co odpowiada formule Si_3N_5 i świadczy o pewnym nadmiarze azotu w porównaniu do stechiometrycznego azotku krzemu Si_3N_4 . Zwiększenie stężenia metanu (jako prekursora węgla) w mieszaninie gazowej powoduje *wbudowywanie się węgla* w strukturę warstw. Jego ilość wzrasta wraz ze wzrostem stężenia CH_4 .

Warstwy otrzymane w warunkach odpowiadających serii 5 zawierają w swoim składzie tylko węgiel i krzem, w stosunku bliskim stechiometrii (przy nieznacznym nadmiarze węgla).

Więcej informacji, dotyczących budowy atomowej warstw, dostarczyły widma absorpcyjne w podczerwieni (RYS.2), zarejestrowane dla próbek osadzonych na (001)Si. Ich szczegółową interpretację zamieszczono w TABELI 3. W widmie warstwy otrzymanej przy użyciu mieszaniny NH_3 i SiH_4 (seria 1) dominuje pasmo przy około 820 cm^{-1} , przypisywane do drgań rozciągających w ugrupowaniu Si–N–Si. W strukturze tych warstw występuje także wodór związany z azotem, o czym świadczą pasma przy około 1140 cm^{-1} , 1530 cm^{-1} , 3300 cm^{-1} oraz wodór związany z krzemem – pasma przy 640 cm^{-1} i 2130 cm^{-1} . Widma warstw otrzymanych przy niewielkim dodatku CH_4 do mieszaniny reakcyjnej (serie 2,4) jakościowo niewiele różnią się od widma dla serii 1. Dodatkowo pojawiają się tutaj bardzo słabe pasma w zakresie $2890\text{--}2940\text{ cm}^{-1}$, które przypisać należy drganiom w ugrupowaniach CH_n . Dopiero 10% (20

Serial/ Series	Zawartość pierwiastka / Element content [at. %]								Wzór/ Formula
	Ti	C	Si	N	N/Si	C/Si	C/N	(C+N)/Si	
1	79,5	0	6,3	10,7	1,7	0	0	1,7	Si_3N_5
2	78,1	5,9	4,2	11,8	2,8	1,4	0,5	4,2	$\text{SiC}_{1,40}\text{N}_{2,57}$
3	77,0	7,2	5,8	10,1	1,7	1,2	0,7	3,0	$\text{SiC}_{1,24}\text{N}_{1,72}$
4	82,4	6,4	6,0	5,3	0,9	1,1	1,2	1,9	$\text{SiC}_{1,07}\text{N}_{0,88}$
5	77,7	11,9	10,4	0	0	1,1	0	1,1	$\text{SiC}_{1,14}$

TABELA 2. Skład chemiczny warstw osadzanych na Ti z zastosowaniem różnych stężeń gazowych prekursorów. Wyniki z analizy widma EDS.

TABLE 2. Chemical composition of the layers deposited on Ti at various gas mixture compositions. The results from EDS spectra.

Pasmo Band [cm^{-1}]	Przyporządkowanie Assignment	Literatura Ref.
640	Si - H wachlarzowe/wagging	[8]
740	Si - C w Si - CH_3 rozciągające/stretching	[7,12]
780	Si - C rozciągające/stretching	[9,10,12]
800-820	Si - C w Si - $(\text{CH}_3)_x$ rozciągające/stretching	[9,10]
820	Si - $(\text{CH}_3)_3$ wahadłowe/rocking	[8,10]
	Si - N - Si rozciągające/stretching	[9]
990	Si - CH_3 wahadłowe/rocking	[9]
1140	N - H zginające/bending	[7-9]
1410	CH_3 w Si - $(\text{CH}_3)_x$ zginające/bending	[7,10]
1530	N - H zginające/bending	[8,11]
2100-2130	Si - H rozciągające/stretching	[7-9]
2890-2940	CH_n rozciągające/stretching	[7,9,10]
3300	N - H rozciągające/stretching	[8,11,12]

TABELA 3. Przypisanie pasm absorpcji widm FTIR, zarejestrowanych dla warstw osadzonych na podłożu (001)Si.

TABLE 3. Assignment of absorption bands in FTIR spectra of the layers deposited on (001)Si.

Serial/ Series	Szerokość Width [μm]	Głębokość Depth [μm]	Pole przekroju bruzdy/ Groove cross - sectional area [μm^2]	Wskaźnik zużycia Wear coefficient [mm^3/Nm]
Ti bez warstwy Ti without layer	162,6±30,9	1,17±0,35	56,1±10,2	44,8±8,1
1	94,5±30,7	0,16±0,08	5,5±2,8	43,9±19,79
4	105,0±4,0	0,14±0,02	4,9±2,0	39,5±13,28
5	90,48±14,16	0,16±0,03	4,9±1,0	49,3±10,47

TABELA 4. Średnia głębokość, szerokość, pole przekroju poprzecznego bruzdy oraz wskaźnik zużycia dla czystego Ti oraz dla próbek serii 1, 4 i 5.

TABLE 4. The average depth, width, groove cross-sectional area and wear coefficient for pure Ti and Ti with chosen layers (series: 1, 4 and 5).

Result and discussions

FIGURE 1 shows SEM images taken for Ti with the layers in comparison with the image of the unmodified sample. The presented images do not show essential differences. They are typical for amorphous or microcrystalline layer materials.

The quantitative relationships characterizing chemical composition of the deposited layers are presented in TABLE 2. The values were calculated from EDS spectra. According to expectations the sample of the series 1 contains only silicon, nitrogen and titanium coming from the substrate (and obviously hydrogen which is not detected in EDS spectrum). The $[\text{N}]/[\text{Si}]$ ratio for this layer equals 1,7 which corresponds to the Si_3N_5 formula and shows a small excess of nitrogen in comparison to the crystalline Si_3N_4 . An introduction of methane into the gas mixture causes an incorporation of carbon to the layer. The content of carbon in the layer increases with increasing methane concentrations.

The layers deposited in the series 5 contain only carbon and silicon at the ratio close to the stoichiometric one (with small carbon excess).

The atomic structure of the deposited materials was analyzed on the basis of FTIR spectra registered for the layers formed on (001)Si (FIG.2). The assignment of the bands present in the spectra is given in TABLE 3. The spectrum of the layer obtained from the mixture of NH_3 and SiH_4 (series 1) is dominated by the band at about 820 cm^{-1} , assigned to stretching vibrations in the Si–N–Si group. The bands at about 1140 cm^{-1} , 1530 cm^{-1} , 3300 cm^{-1} and at about 640 cm^{-1} , 2130 cm^{-1} confirm the presence of hydrogen bonded to nitrogen and silicon.

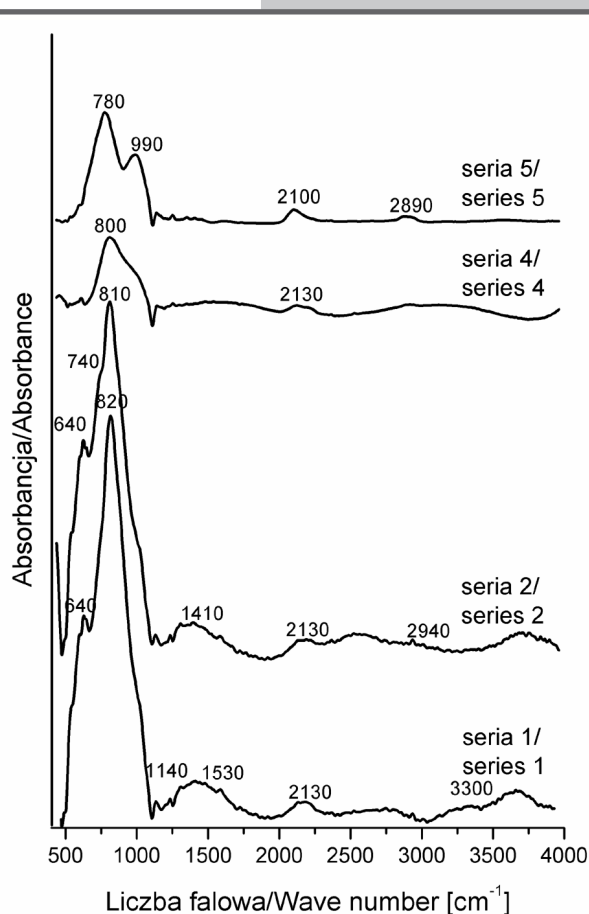
The spectra of the layers formed at low CH_4 concentration (series 2 and 3) do not differ qualitatively from the spectra of the layer of the series 1. A very weak band within the

range $2890\text{--}2940\text{ cm}^{-1}$ can be attributed to the vibrations in CH_n groups ($n=1,2,3$). The layer formed at the 10% CH_4 concentration (20 sccm) exhibits clearly different structure. The absorption band located between 500 and 1000 cm^{-1} has strong inflection related to the localization of the SiC in

sccm) udział CH_4 w mieszaninie gazowej powoduje zasadnicze zmiany struktury warstw. Pasma w zakresie $500\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ ulega silnemu przeięciu, następuje lokalizacja drgań pochodzących od ugrupowań typu SiC w $\text{Si}-(\text{CH}_3)_x$. Ponadto ilość ugrupowań typu Si-H relatywnie spada, o czym świadczy zanik pasma przy 2130 cm^{-1} . W widmach warstw serii 5 (otrzymanych bez udziału NH_3 w mieszaninie gazowej) widoczne są tylko pasma pochodzące od drgań w ugrupowaniach Si-C (około 780 cm^{-1}) i Si- CH_3 (około 990 cm^{-1}) oraz słabe pasma przy około 2100 cm^{-1} (Si-H) i 2890 cm^{-1} (CH_n).

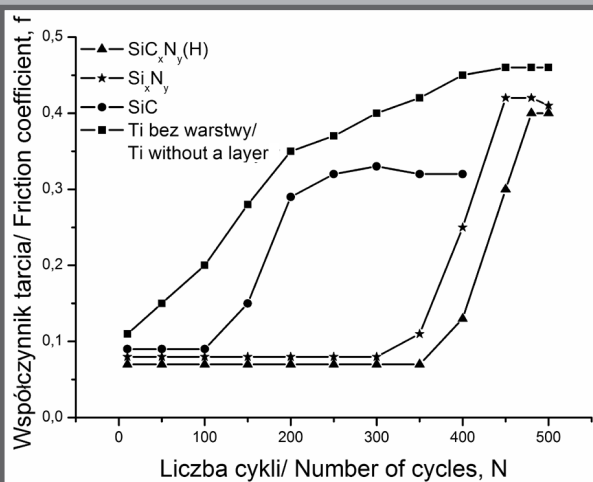
Badania właściwości tribologicznych próbek obejmowały wyznaczenie współczynnika tarcia podczas ślizgania w ruchu obrotowym oraz odporności na zużycie przez tarcie. Badania te wykonano na sucho, w styku kula - płaszczyzna. Przeciwpróbką w tych badaniach była kulka o średnicy 6 mm, wykonana ze stali łożyskowej, o polerowanej powierzchni. Na RYSUNKU 3 przedstawiono wartości średniego współczynnika tarcia, zarejestrowane podczas współpracy próbek surowych i z nałożonymi warstwami. Najwyższą wartość współczynnika tarcia w całym zakresie pomiarowym (500 cykli) posiada wyjściowe podłoże Ti (tytan bez warstwy). Próbki z warstwą Si_3N_4 i próbki z warstwą $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$ wykazują bardzo dobre właściwości ślizgowe do 350 cykli ($f < 0,1$), potem współczynnik tarcia rośnie w wyniku przecierania się warstwy. Niemniej jednak utrzymuje się on na niższym poziomie w porównaniu z wyjściowym podłożem. Najmniejszą wartość współczynnika tarcia posiada próbka z warstwą $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$.

Zużycie badanych próbek miało głównie charakter ścierny, a możliwe zużycie adhezyjne mogło mieć miejsce tylko podczas tarcia materiałów podłoża. Wyniki pomiarów odporności na zużycie badanych próbek zawiera TABELA 4. Największą odporność na zużycie, spośród badanych próbek, posiada Ti z warstwą $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$ (wskaźnik zużycia = $39,5 \cdot 10^{-6}\text{ mm}^3/\text{Nm}$), a najmniejszą próbka z warstwą SiC. Dodatek azotu wpływa więc korzystnie na właściwości ściernie badanych warstw. Musi się on utrzymywać się na poziomie, który zapewni elastyczność warstwy $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$ (w przeciwieństwie do kruchego węgla krzemu).



RYS.2. Wzorcowe widma FTIR warstw osadzonych na podłożu (001)Si przy różnych stężeniach gazowych prekursorów.

FIG.2. FTIR spectra for the layers deposited on (001)Si at various gas mixture concentrations.



RYS.3. Średni współczynnik tarcia wyznaczony dla próbek serii 1, 4 i 5 oraz dla Ti bez warstwy.

FIG.3. The average friction coefficient f measured for the samples of the series 1, 4 and 5 and for Ti without layer.

$\text{Si}-(\text{CH}_3)_x$ vibrations. A decay of the band located at 2130 cm^{-1} relates to a decrease of a number of Si-H groups. In the spectra of the layers from the series 5, the bands assigned to Si-C (at about 780 cm^{-1}) and $\text{Si}-(\text{CH}_3)_x$ vibrations (at about 990 cm^{-1}) are present. Two additional weak bands at 2100 cm^{-1} and 2890 cm^{-1} assigned to Si-H and CH_n can be seen.

Studies of tribological properties of the layers deposited on Ti substrate included measurements of the friction coefficient at sliding during rotation and measurements of resistance to wear by friction. The measurements were performed at a dry "ball - disc" contact. The ball made of bearing steel of the diameter equal to 6 mm was used. The obtained results are given in TABLE 4, FIGURE 3. FIGURE 3 shows a comparison of the average values of the friction coefficients measured for unmodified Ti and for Ti substrate with various layers.

The highest friction coefficient (within 500 cycles) has Ti without layer. The samples with Si_3N_4 and $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$ layers exhibit very good sliding properties up to 350 cycles ($f < 0,1$). Then the friction coefficient increases as a result of the layer sawing. Nevertheless, it remains at the level lower than the values for unmodified Ti. The smallest friction coefficients were measured for titanium with $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$ layer.

The observed wear of the samples has mainly abrasive character. The adhesive wear can take place only at friction of the substrate surface. The results of the measurements of wear resistance are presented in TABLE 4. The highest wear resistance has the sample with $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$ layer (Wear coefficient = $39,5 \cdot 10^{-6}\text{ mm}^3/\text{Nm}$), and the smallest one has been measured for the sample with SiC layer. Thus, the addition of nitrogen improves abrasive properties

of the layer. It can be assumed that this addition must keep at the level providing elasticity of $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$ – in contradiction to brittle silicon carbide.

Serię warstw, o różnej strukturze oraz o różnej zawartości krzemu, azotu i węgla, osadzono na podłożu Ti Grade 2, w procesie MWCVD. Zmianę składu chemicznego warstw uzyskano poprzez odpowiedni dobór składu mieszaniny gazów reakcyjnych (SiH_4 , NH_3 , CH_4 , Ar). Otrzymano warstwy amorficzne typu: SiC_x , Si_xN_y i $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$. W badaniach właściwości tribologicznych potwierdzono, że w sposób istotny zależą one od udziału poszczególnych pierwiastków. Najlepsze właściwości wykazują próbki z warstwą węglazotku krzemu, które łączą właściwości twardego SiC i bardziej elastycznego Si_3N_4 .

The series of the layers of various atomic structures and various contents of silicon, nitrogen and carbon were deposited on Ti Grade 2 at MWCVD processing. A differentiation of the chemical composition was achieved thanks to the proper choice of the reactive gas mixture composition (SiH_4 , NH_3 , CH_4 , Ar). The amorphous layers of the following types were formed: SiC_x , Si_xN_y and $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$.

It has been shown that the tribological properties of the synergic "substrate - layer" system depend on the chemical composition of the layer. The best operational parameters has been found in the case of $\text{SiC}_x\text{N}_y(\text{H})$ layers which combine properties of hard SiC and more flexible Si_3N_4 .

Piśmiennictwo

- [1] Nałęcz M.: Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna 2000. Tom 4 Biomateriały, Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, Warszawa 2003.
- [2] Geetha M., Singh A. K., Asokamani R., Gogia A. K.: Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review. Progress in Materials Science 54 (2009) 397 - 425.
- [3] Marciniak J.: Biomateriały, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej 2002.
- [4] Miinomi M.: Recent research and development in titanium alloys for biomedical applications and healthcare goods. Science and Technology of Advanced Materials 4 (2003) 445 - 454.
- [5] Miinomi M.: Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials I (2008) 30 - 42.
- [6] Liu X., Chu P. K., Ding Ch.: Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. Materials Science and Engineering R 47 (2004) 49 - 121.
- [7] E. Vassallo, A. Cremona, F. Ghezzi, F. Delleria, L. Laguardia, G. Ambrosone, U. Coscia: Structural and optical properties of amorphous hydrogenated silicon carbonitride films produced by PECVD. Applied Surface Science 252 (2006) 7993 - 8000.

References

- [8] W. Kafrouni, V. Rouessac, A. Julbe, J. Durand: Synthesis of PECVD a- $\text{SiC}_x\text{N}_y\text{:H}$ membranes as molecular sieves for small gas separation. Journal of Membrane Science 329 (2009) 130 - 137.
- [9] M. T. Kim, J. Lee: Characterization of amorphous SiC:H films deposited from hexamethyldisilazane. Thin Solid Films 303 (1997) 173 - 179.
- [10] C. Vautrin - UI, C. Boisse - Laporte, N. Benissad, A. Chausse, P. Leprince, R. Messina: Plasma - polymerized coatings using HMDSO precursor for iron protection. Progress in Organic Coating 38 (2000) 9 - 15.
- [11] L. S. Patil, R. K. Pandey, J. P. Bange, S. A. Gaikwad, D. K. Gautman: Effect of deposit temperature on the chemical properties of thermally deposited silicon nitride films. Optical materials 27 (2005) 663 - 670.
- [12] R. Gonzalez- Luna, M. T. Rodrigo, C. Jimenez, J. M. Martinez-Duart: Deposition of silicon oxinitride films from hexamethyldisilazane (HMDS) by PECVD. Thin Solid Films 317 (1998) 347-350.

CHARAKTERYSTYKA USIECIOWANYCH BIOMATERIAŁÓW NA BAZIE KOLAGENU I ELASTYNY

J.SKOPINSKA-WISNIEWSKA*, A.SIONKOWSKA, M.GAWRON,
J.KOZŁOWSKA, A.PŁANECKA

UNIwersytet Mikołaja Kopernika, Wydział Chemii,
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń, Polska

*MAILTO: JOANNA@CHEM.UNI.TORUN.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101,(2010),97-99]

Wstęp

Kolagen i elastyna to białka strukturalne, będące głównymi komponentami macierzy zewnątrzkomórkowej. Kolagen charakteryzuje się bardzo wysoką wytrzymałością na rozciąganie, podczas gdy elastyna wykazuje niezwykłą elastyczność. Właściwości mechaniczne obu białek znakomicie się uzupełniają, dzięki czemu kolagen i elastyna zapewniają odporność mechaniczną tkankom łącznym różnego rodzaju. Szczególnie bogate w te białka są tkanki i organy poddane

THE CHARACTERIZATION OF CROSS-LINKED COLLAGEN AND COLLAGEN/ELASTIN BASED BIOMATERIALS

J.SKOPINSKA-WISNIEWSKA*, A.SIONKOWSKA, M.GAWRON,
J.KOZŁOWSKA, A.PŁANECKA

NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY, FACULTY OF CHEMISTRY, 7
GAGARINA STREET, 87-100 TORUN, POLAND

*MAILTO: JOANNA@CHEM.UNI.TORUN.PL

[Engineering of Biomaterials, 99-101,(2010),97-99]

Introduction

Collagen and elastin are structural proteins, the main components of extracellular matrix. The collagen reveals high tensile strength whereas the elastin exhibits unusual elasticity. The mechanical properties of these proteins are complementary and provide a resilience of all kinds of connective tissues. Especially the load-bearing tissues such as bones, tendons, lungs, skin and arteries are collagen and elastin rich. In addition, the proteins ability to improving the

znacznym obciążeniami, bądź wielokrotnemu rozciąganiu takie jak kości, ścięgna, płuca, skóra, naczynia krwionośne. Kolagen i elastyna wspomagają adhezję i proliferację komórek, które następnie wytwarzają elementy macierzy zewnątrzkomórkowej. Dzięki tym cechom oba białka od wielu już lat znajdują się w kręgu zainteresowań badaczy z dziedziny technologii biomateriałów i inżynierii tkankowej [1-3]. Jednakże, zarówno zastosowanie, jak i badanie tych białek jest ograniczone ze względu na stosowane obecnie procedury ich oczyszczania. Natywna elastyna, ze względu na bardzo wysoki stopień usieciowania, jest nierozpuszczalna. To sprawia, że komercyjnie dostępne rozpuszczalne postacie elastyny otrzymywane są na drodze hydrolizy, która powoduje zniszczenie unikalnej trójwymiarowej struktury białka i w konsekwencji zmianę właściwości. Stąd, prowadzone są badania nad przywróceniem niezwyklej architektury składników macierzy zewnątrzkomórkowej [4].

Celem pracy było zbadanie zmian właściwości biomateriałów na bazie kolagenu i elastyny w skutek sieciowania termicznego w różnych warunkach.

Materiały i metody

Roztwór kolagenu ze ścięgien ogonowych młodych szczurów w 0,1M kwasie octowym został sporządzony w naszym laboratorium zgodnie z wcześniej opisaną metodą [5].

Nierozpuszczalną elastynę uzyskano oczyszczając aorty świnię metodą Lansing'a. Aorty zostały pozabawione otaczających tkanek i odfuszczone. Tkankę umieszczono w 0,1M roztworze NaOH i ogrzewano przez 50 min w temperaturze 95°C. Otrzymany materiał rozdrobniono w ciekłym azocie [6]. Proszek elastynowy (1g) poddano hydrolizie zasadowej. Otrzymany roztwór zneutralizowano kwasem octowym i dializowano względem wody dejonizowanej.

Mieszaniny białek otrzymano przez dodanie do roztworu kolagenu i zmieszanie 10% hydrolizatów elastyny (w przeliczeniu na suchą masę). Cienkie filmy otrzymano przez wylanie roztworów na wypoziomowane płytki szklane i odparowanie rozpuszczalnika.

Próbki wygrzewano w 60°C i 100°C przez 2 i 24 godziny.

Wyniki i dyskusja

Na podstawie przeprowadzonej analizy termicznej filmów kolagenowych oraz kolagenowo-elastynowych, zarówno niesieciowanych jak i poddanych sieciowaniu termicznemu w różnych warunkach, stwierdzono, że degradacja termiczna przebiega w dwóch etapach. Pierwszy etap rozkładu, widoczny pomiędzy 25°C i 100°C, związany jest z odparowaniem wody zaabsorbowanej przez białka. Zaobserwowano, że T_{max} pierwszego etapu rozkładu termicznego usieciowanych materiałów kolagenowych jest niższa niż dla filmów nie poddanych sieciowaniu (TAB.1). Obniżenie temperatury jest szczególnie widoczne w przypadku wygrzewania w czasie 2 godzin, zarówno w temperaturze 60°C jak i 100°C. Dla próbek kolagenowo-elastynowych zanotowano natomiast wzrost temperatury parowania wody absorpcyjnej po sieciowaniu w 60°C. Efekt ten może być związany z uwięzieniem cząsteczek wody w usieciowanej strukturze materiału. Nie zaobserwowano znaczących różnic pomiędzy ubytkami mas dla próbek kolagenowo-elastynowych przed i po sieciowaniu.

Drugi etap rozkładu termicznego materiałów na bazie kolagenu i elastyny obserwowany jest pomiędzy temperaturą 280°C i 400°C i wiąże się z odparowaniem wody związanej oraz rozkładem termicznym łańcucha polipeptydowego i

cells adhesion and promoting the production of extracellular matrix from proliferating cells, makes that collagen and elastin have been the focus in biomaterials technology and tissue engineering since many years [1-3]. However, the use of the proteins, particularly the elastin, is limited because of the procedures of purification which are applied nowadays. Native elastin is extremely insoluble owing to its cross-linking degree. Commercially available soluble elastins are obtained from the insoluble protein by hydrolysis, which destroys its unique 3-D structure. So, many scientists work on the reconstruction of the architecture of main components of the extracellular matrix [4].

The aim of our work was the study the influence of different thermal cross-linking conditions on properties of collagen-elastin based biomaterials.

Materials and methods

The solution of collagen from tail tendons of young albino rats in 0,1M acetic acid was obtained in our laboratory [5].

Insoluble elastin was purified from pig aortas by Lansing's method. Pig's aorta was cleaned from adhering tissues and de-fatted by extractions in ethanol an ether. The tissue was placed in 0.1M NaOH and heated to 95°C for 50 minutes. Dry material was minced in liquid nitrogen [6]. Elastin powder (1g) was hydrolysed in an alkaline conditions. The resulting solution was neutralised with acetic acid and then dialysed against deionised water .

The collagen/elastin samples were prepared by addition of 10% of elastin hydrolysates The protein films were obtained by solvent evaporation from solutions poured onto glass plates.

The samples were heated at 60°C and 100°C during 2h and 24h.

Results and discussion

During thermal analysis the two-stages of degradation process were noted. The first stage (between 25 and 100°C) is connected with the evaporation of water absorbed

Specimen	I stage	
	T_{max} [°C]	Δm [%]
Collagen not cross-linked	66,82	13,87
Collagen; 60°C, 2h	49,87	12,40
Collagen; 60°C, 24h	62,30	10,80
Collagen; 100°C, 2h	52,13	14,79
Collagen; 100°C, 24h	66,82	13,94
Collagen/elastin not cross-linked	77,00	7,59
Collagen/elastin; 60°C, 2h	81,50	7,26
Collagen/elastin; 60°C, 24h	80,39	7,51

TABELA 1. Wartości temperatur i ubytków masy I etapu degradacji termicznej filmów z kolagenu i mieszanin kolagenu z hydrolizatami elastyny przed i po sieciowaniu termicznym; temperatura w maksimum szybkości procesu (T_{max}) i ubytek masy następujący w czasie ogrzewania (Δm).

TABLE 1. Thermal parameters for the I stage of thermal decomposition of collagen and collagen/elastin films before and after thermal cross-linking; the temperature of the maximum speed of the process (T_{max}) and the mass decrement during the heating process (Δm).

Specimen	II stage	
	T_{max} [°C]	Δm [%]
Collagen not cross-linked	308,99	62,43
Collagen; 60°C, 2h	321,40	58,76
Collagen; 60°C, 24h	308,88	50,98
Collagen; 100°C, 2h	306,98	70,27
Collagen; 100°C, 24h	313,22	71,70
Collagen/elastin not cross-linked	314,85	69,27
Collagen/elastin; 60°C, 2h	316,26	65,39
Collagen/elastin; 60°C, 24h	311,81	61,78

TABELA 2. Wartości temperatur i ubytków masy II etapu degradacji termicznej filmów z kolagenu i mieszanin kolagenu z hydrolizatami elastyny przed i po sieciowaniu termicznym; temperatura w maksimum szybkości procesu (T_{max}) i ubytek masy następujący w czasie ogrzewania (Δm).

TABLE 2. Thermal parameters for the II stage of thermal decomposition of collagen and collagen/elastin films after thermal cross-linking; the temperature of the maximum speed of the process (T_{max}) and the mass decrement during the heating process (Δm).

wytworzeniem małych cząsteczkowych, często lotnych, produktów degradacji. Proces ten zachodzi z maksymalną szybkością w temperaturze około 309°C dla materiału kolagenowego i 315°C w przypadku filmów z dodatkiem elastyny (TAB.2). Wyrzwanie próbek w 60°C przez 2 godziny powoduje wzrost wartości T_{max} drugiego etapu rozkładu termicznego. Zmiana ta świadczy o zwiększeniu liczby wiązań poprzecznych w badanym materiale. Także zmniejszenie wartości ubytków mas potwierdza, iż sieciowanie próbek w opisanych warunkach prowadzi do stabilizacji struktury filmów białkowych. Należy również zauważyć, że wygrzewanie w 60°C prowadzi do uzyskania bardziej termostabilnego materiału niż prowadzenie procesu w 100°C.

Zaobserwowano także, że w efekcie sieciowania termicznego dochodzi do wytworzenia w próbkach nierozpuszczalnego żelu, co dodatkowo potwierdza tworzenie nowych wiązań sieciujących. Stwierdzono, że ilość powstającego żelu jest większa w przypadku próbek zawierających oba białka, niż dla filmów kolagenowych (TAB.3). Sugeruje to, że obecność hydrolizatów elastyny sprzyja tworzeniu nowych wiązań sieciujących w skutek działania podwyższonej temperatury. Efekt ten może być związany z większą mobilnością stosunkowo krótkich łańcuchów hydrolizatów elastyny, dzięki czemu łatwiej dochodzi do zbliżenia odpowiednich grup funkcyjnych obecnych w białkach i uczestniczących w tworzeniu nowych wiązań.

Piśmiennictwo

- [1] W.F.Daamen, H.Th.B van Moerkerk, T. Hafmans, L. Buttafoco, A.A. Poot, J.H. Veerkamp, T.H. van Kuppevelt, Preparation and evaluation of molecularly-defined collagen-elastin-glycosaminoglycan scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials* 2003, Vol. 24, 4001-4009
- [2] A.J. Bailey, Molecular mechanisms of ageing in connective tissues, *Mechanisms of Ageing and Development*, 2001, Vol. 122, 735-755
- [3] J. Skopińska-Wiśniewska, A. Sionkowska, A. Kamińska, A. Kaźnica, R. Jachimski, T. Drewna, Surface characterization of collagen/elastin based biomaterials for tissue regeneration, *Applied Surface Science*, 2009, Vol. 255, 8286-8292

Specimen	Gel [%]
Collagen; 60°C, 2h	97,53
Collagen; 60°C, 24h	97,63
Collagen; 100°C, 2h	97,35
Collagen; 100°C, 24h	86,28
Collagen/elastin not cross-linked	98,52
Collagen/elastin; 60°C, 2h	99,47
Collagen/elastin; 60°C, 24h	99,58

TABELA 3. Zawartość żelu dla filmów z kolagenu i kolagenu z dodatkiem hydrolizatów elastyny poddanych sieciowaniu termicznemu.

TABLE 3. The amount of gel in collagen and collagen/elastin films after thermal cross-linking

to proteins. For cross-linked collagen we observed that T_{max} of this stage was lower than for non cross-linked one (Tab.1). Especially for samples heated by 2h, both in 60°C and 100°C, we observed the lower values of T_{max} . However, for collagen/elastin specimens the temperature of water evaporation increased after heating at 60°C. It shows that molecules of water were trapped in cross-linked structure. In case of collagen/elastin films the alteration of weight loss in the first stage after thermal modification was not significant.

In the second stage (between 280 and 400°C) water bounded to proteins is released and small molecular products of thermal degradation of polypeptides are formed. The maximum speed of the process was observed around 309°C for collagen and 315°C for collagen/elastin films (Tab.2). The heating of the specimen in 60°C by 2h caused increase the value of the temperature of maximum speed of the process. It suggests that the new cross-linking bonds were created. The lower values of mass decrement confirm that these conditions lead to the stabilization of the structure of protein samples. It should be noted that heating at 100°C is not so effective as a cross-linking at 60°C.

After thermal cross-linking we observed the gel formation, what confirmed that additional cross-links have been formed. The highest amount of gel (among specimen studied) was noted for collagen/elastin films (TAB.3). We can conclude that the presence of elastin hydrolyzates makes creation of new cross-linking bonds easier. It could be connected with higher mobility of short elastin hydrolyzates chains than collagen polypeptides.

References

- [4] K. Miyamoto, M. Atarashi, H. Kadozono, M. Shibata, Y. Koyama, M. Okai, A. Inakuma, E. Kitazono, H. Kaneko, T. Takebayashi, T. Horiuchi, Creation of cross-linked electrospun isotypic-elastin fibers controlled cell-differentiation with new cross-linker, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2009, Vol. 45, 33-41
- [5] J.Habermehl, J. Skopinska, F. Boccafroschi, A. Sionkowska, H. Kaczmarek, G. Laroche, D. Mantovani, Preparation of ready-to-use, stockable and reconstituted collagen, *Macromolecular Bioscience* 2005, Vol. 5, 821-828
- [6] T.B.W.N.T. Sosokel, L.B. Sandberg, Isolation and characterization of insoluble and soluble elastin, *Methods of Enzymology* 144 (1987) 196-214.

NANOCZĄSTKI O STRUKTURZE RDZEŃ-POWŁOKA DO ENKAPSULACJI I TRANSPORTU PEPTYDÓW

BARBARA ROBAK¹, PAWEŁ WEDA¹, RADOWSŁAW KOZAK¹,
JERZY SILBERRING^{1,2}, BARBARA TRZEBICKA¹, Andrzej Dworak¹

¹POLSKA AKADEMIA NAUK,
CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH,
UL. MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ 34, 41-819 ZABRZE, POLSKA,
²AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA IM. ST. STASZICA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
AL. A. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA
*MAILTO: BARBARA.ROBAK@CMPW-PAN.EDU.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 100-101]

Substancje aktywne biologicznie takie jak białka i peptydy przez wiele lat były badane pod kątem potencjalnego zastosowania farmakologicznego. W wielu przypadkach ich hydrofilowa natura i zbyt krótki okres cyrkulacyjny w organizmie człowieka powoduje, że ich ustne dostarczanie do określonego miejsca jest niemożliwe. Substancje aktywne biologicznie mogą powodować odpowiedź immunologiczną organizmu, ulegać enzymatycznej degradacji i wyeliminowaniu z układu krążenia. Konieczność polepszania skuteczności terapii farmakologicznych doprowadziła do wzrostu zainteresowania enkapsulacją jako potencjalną metodą pozwalającą na dostarczanie w kontrolowany sposób leków i innych substancji aktywnych biologicznie. Enkapsulacja nie tylko chroni te substancje, ale także przedłuża ich działanie, co znacznie polepsza skuteczność terapii [1-4].

W ostatnich latach bardzo dużym zainteresowaniem cieszą się układy polimerowe stosowane jako kapsuły ochronne, w których umieszcza się aktywną molekułę i wprowadza do określonego miejsca w ludzkim organizmie [5-7]. Często biomolekuły wprowadzone są do wnętrza nanocząstek poprzez enkapsulację bądź adsorpcję. Zdarza się również, że lepszą wydajność enkapsulacji otrzymuje się poprzez połączenie biomolekuły wiązaniem kowalencyjnym z polimerem tzw. biokonjugacja [8-11].

Wiele uwagi poświęcono również wykorzystaniu termoczułości niektórych polimerów do otrzymywania układów do enkapsulacji i dostarczania leków [12]. W wyniku ogrzewania roztworu termoczułego polimeru powyżej dolnej krytycznej temperatury rozpuszczalności (LCST) wiązania wodorowe pomiędzy łańcuchami polimeru a rozpuszczalnikiem (wodą) ulegają rozerwaniu, a polimer wytrąca się z roztworu. W odpowiednich warunkach, rozcieńczone roztwory polimerów powyżej LCST mogą tworzyć stabilne, sferyczne struktury - tzw. mezoglobule [13-16]. Najczęściej opisywanym polimerem termoczułym jest poli(N-izopropylakryloamid) (PNIPAM). W oparciu o procedurę otrzymywania struktur rdzeń-powłoka opisaną w pracy [17], do enkapsulacji peptydów wykorzystano zjawisko termoczułości PNIPAM. PNIPAM w temperaturze pokojowej jest rozpuszczalny w wodzie, podczas ogrzewania roztworu powyżej LCST, zmienia swój hydrofilowy charakter na hydrofobowy, agreguje tworząc stabilne mezoglobule (patrz rys. poniżej). Ze względu na odwracalność procesu mezoglobule muszą być stabilizowane. W tym celu otaczane są powłoką, otrzymywaną na drodze polimeryzacji rodnikowej nukleowanej na powierzchni mezoglobul.

W prezentowanej pracy przedstawiono wyniki badań nad enkapsulacją peptydu NOCYCEPTYNY (FGGFTGARKSARKLAN) prowadzoną podczas otrzymywania mezoglo-

CORE-SHELL NANOPARTICLES FOR ENCAPSULATION AND TRANSPORT OF PEPTIDES

BARBARA ROBAK¹, PAWEŁ WEDA¹, RADOWSŁAW KOZAK¹,
JERZY SILBERRING^{1,2}, BARBARA TRZEBICKA¹, Andrzej Dworak¹

¹POLISH ACADEMY OF SCIENCES,
CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,
34 MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ STR., 41-819 ZABRZE, POLAND,
²AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
30 MICKIEWICZA AVE., 30-059 CRACOW, POLAND
*MAILTO: BARBARA.ROBAK@CMPW-PAN.EDU.PL

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 100-101]

The potential use of biomolecules such as proteins and peptides as therapeutic agents has been widely investigated. Hydrophilic nature and short-time activity of many peptides make its oral delivery to the desired site of a human body impossible. In many cases they may cause dangerous immune response or can be easily eliminated from the systemic circulation due to enzymatic degradation and excretion. In the last decade increased interest in the area of formulations development that protect and stabilize biomolecules can be observed [1-4].

To provide protection biomolecules might be encapsulated inside the protective "capsules" made from polymeric materials and delivered to the desired place [5-7]. Usually biomolecules such as proteins or peptides are placed inside the nanoparticle via either encapsulation or physical adsorption. However sometimes it is also convenient to covalently attach biomolecule to the polymer, what is called bioconjugation [8-11].

Attention has been paid to the thermosensitive materials as precursors of stimuli-responsive drug delivery systems [12]. Thermosensitive polymers undergo phase transition above temperature called lower critical solution temperature (LCST). When the temperature of solution containing such polymer increases above the phase transition temperature (LCST), and the hydrogen bonds between soluble polymer and solvent (water) are broken, the polymer starts to precipitate. When the solution is diluted and the heating is performed in controlled manner polymers do not precipitate, but start to form stable nanoparticles called mesoglobules [13-16]. Most intensively investigated and described polymer among thermosensitive ones is poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM). In our previous work [17] we proposed the new route to prepare core-shell nanoparticles based upon thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) that can be potentially used for peptides encapsulation and delivery. PNIPAM at room temperature is water soluble polymer but upon heating above LCST, it changes its hydrophilic nature into hydrophobic and forms stable nanoparticles (see fig. below). Due to the reversibility of the aggregation process, mesoglobules used for encapsulation need to be stabilized. Radical polymerization nucleated by surface of mesoglobules was used to create a protective shell stabilizing thermosensitive interior.

Here we explore the idea to encapsulate a peptide NOCICEPTIN (FGGFTGARKSARKLAN) into PNIPAM mesoglobules during the process of their formation. The studies on peptides were preceded by the experiments with model substance - poly(2-ethyl-2-oxazoline) (PEtOx), mimicking peptide structure [18].

Influence of encapsulation conditions such as rate of

bul PNIPAM. Badania z wykorzystaniem peptydów zostały poprzedzone badaniami z użyciem modelowej substancji mimikującej strukturę peptydów poli(2-etylo-2-oksazolinu) (PEtOx) [18].

Badano wpływ warunków enkapsulacji takich jak szybkość i sposób grzania roztworów, masę i stężenie polimerów na wielkość powstających nanocząstek.

Wykorzystując oddziaływania fizykochemiczne pomiędzy termoczułym PNIPAM, a peptydem/PEtOx otrzymano mieszane mezoglobule, które następnie otoczono powłoką z poli(metakrylanu 2-hydroksyetylu) (PHEMA) lub PNIPAM na drodze rodnikowej polimerizacji w obecności odpowiedniego czynnika sieciującego i inicjatora. Schematyczny przebieg procesu otrzymywania mieszanych mezoglobul przedstawiono poniżej.

Ponieważ nanokontenery docelowo mają służyć do transportu i uwolnienia zawartych w nich peptydów np. we wnętrzu komórki, niezbędne jest skonstruowanie powłoki w sposób, który to umożliwi. Planuje się wprowadzenie do powłoki degradowalnych enzymatycznie wiązań, które w odpowiednich warunkach ulegną zniszczeniu. Wiązania zostaną wprowadzone poprzez zawierający je czynnik sieciujący. W tym celu planuje się wprowadzenie enzymatycznie degradowanych wiązań disulfidowych. W obecności enzymu – tioredoksyny lub niskocząsteczkowego ditiotreitolu ulegają one redukcji i rozpadają się tworząc ugrupowania tiolowe [19].

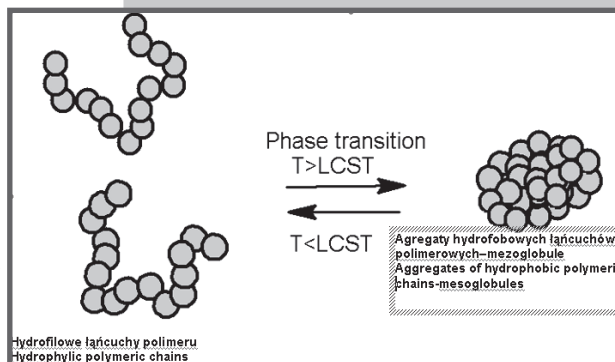
Przedstawiony proces enkapsulacji peptydów w trakcie tworzenia mezoglobul nie wymaga ich oczyszczania, jak to ma miejsce w wypadku innych metod. Oddziaływania fizykochemiczne, a co za tym idzie brak wiązań kowalencyjnych między peptydem a nanokontenerem, nie powinien wpływać na aktywność biologiczną peptydu.

Proces otrzymywania nanocząstek o strukturze rdzeń-powłoka jest badany za pomocą dynamicznego rozpraszania światła, a morfologia z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych oraz skaningowej mikroskopii elektronowej.

Podziękowanie

Praca współfinansowana ze środków Polskiego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach grantu NN 209 144136.

Barbara Robak jest stypendystką Europejskiego Funduszu Społecznego, w ramach projektu RFSD 2.



heat transfer, polymers concentration and molar masses on the particles size and size distribution were investigated.

The physical interactions between PNIPAM and the neuropeptide

or PEtOx chains upon heating of its water solution above LCST result in formation of mixed mesoglobules. Mixed mesoglobules were stabilized by the protective shell via nucleated radical polymerization of HEMA or NIPAM in the presence of cross-linking agent and initiator. The schematic procedure of encapsulation of peptide is presented below.

The nanocontainers should be used to transport the active content to the desired place (e.g. the interior of the cell) and to release it there. For this purpose, a mechanism to destroy the protective shell is required. For this purpose enzymatically breakable bonds will be introduced by crosslinking agent used for the shell formation. Enzymatically degradable disulfide bonds are good candidates for this purpose. In the presence of enzyme- thioredoxin or low molecular dithiothreitol they easily undergo cleavage to thiols [19].

Presented encapsulation method does not require complicated and tedious reservoir purification before peptide encapsulation. This method allow peptide incorporation into the nanoparticles via physical interaction so the lack of covalent bonds between the nanoparticles and peptide should not cause any changes in peptide activity.

The process of mesoglobules and core-shell particles formation is followed by dynamic light scattering, atomic force microscopy and scanning electron microscopy.

Acknowledgments

This work was supported by Polish Ministry of Science and Higher Education grant NN 209 144136. Barbara Robak is a scholar within the RFSD 2 project funded by the European Social Fund.

Piśmiennictwo

- [1] T. Freytag et al., *Journal of Controlled Release* 69 (2000) 197
- [2] X. Li et al., *Journal of Applied Polymer Science* 66 (1997) 583
- [3] A. Giteau et al., *International Journal of Pharmaceutics* 350 (2008) 14
- [4] J. Xie et al., *Biotechnology and Bioengineering* 97 (2007) 1278
- [5] Ch.Dai et al., *Colloids and Surfaces: Biointerfaces* 41 (2005) 117
- [6] Y.Yamaguchi et al., *Journal of Controlled Release* 81 (2002) 235
- [7] V. R.Sinha et al., *Journal of Controlled Release* 90 (2003) 261
- [8] L. Sun et al., *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 345 (2009) 173
- [9] V. P. Torchilin et al., *Drug Discoveries & Therapeutics* 6 (2003) 259

References

- [10] S. Taylor et al., *Biomacromolecules* 5 (2004) 245
- [11] W. R. Gombotz et al., *Bioconjugate Chemistry* 6 (1995) 332
- [12] A.J. Wang et al., *Material Science and Engineering: A* 460 (2007) 1
- [13] A.V. Gorelov et al., *Physica A* 240 (1997) 443
- [14] K.A. Dawson et al., *Physica A* 244 (1997) 68
- [15] L.T. Lee et al., *Macromolecules* 30 (1997) 6559
- [16] V. Aseyev et al., *Polymer* 46 (2005) 7118
- [17] P. Weda et al., *Polymer* 49 (2008) 1474
- [18] H.Schlaad et al., *Macromolecular Rapid Communications*, 31 (2010) 511
- [19] L. Zhang et al., *Biomacromolecules*, 9 (2008) 3321

WŁAŚCIWOŚCI TRIBOLOGICZNE SPIEKANYCH STOPÓW TYTANU DO ZASTOSOWAŃ BIOMEDYCZNYCH

PIOTR DEPTUŁA

POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA, WYDZIAŁ MECHANICZNY
UL. WIEJSKA 45C, 15-351 BIAŁYSTOK, POLSKA
MAILTO: JRD@PB.EDU.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101,(2010),102-104]

Wprowadzenie

Na przełomie ostatnich lat wzrastające wymagania współczesnej medycyny stawiane biomateriałom, skłaniają do stosowania nowych rozwiązań technologicznych, które pozwoliłyby na otrzymanie materiałów lepiej spełniających stawiane im cele. Tytan i jego stopy uważa się za najbardziej obiecujące metaliczne biomateriały, z powodu kombinacji dobrych właściwości mechanicznych i biokompatybilności w środowisku tkankowym. Materiały te są szeroko stosowane w medycynie, w produkcji elementów rekonstrukcyjnych dla zespołów kości, implantów protetycznych i endoprotez stawów [1-4].

Zastosowanie stopów tytanu jako powierzchnie tarcia w endoprotezoplastyce jest ograniczone przez słabe właściwości tribologiczne i słabą odporność na zużycie [1-4]. Liczne badania skupione są na modyfikacji właściwości tribologicznych tytanu, głównie za pomocą metod inżynierii powierzchni, jak implantacja jonów, azotowanie i osadzanie cienkich odpornych na zużycie warstw. Jednakże długoterminowe obserwacje powierzchni tarcia implantów pokazały niebezpieczeństwo lokalnych zniszczeń i rozwarstwienia cienkich warstw co intensyfikuje zużycie i może powodować potrzebę reimplantacji [5,6]. Stopy tytanu ze względu na swoje właściwości są trudne do obróbki plastycznej i wiórowej, dlatego poszukuje się nowych technologii, które dadzą nam nowe możliwości w otrzymywaniu bardziej konkurencyjnych stopów i kompozytów na bazie tytanu do zastosowań biomedycznych. Metalurgia proszków pozwala tworzyć materiały kompozytowe z szeroką gamą wypełniaczy, które poprawiają właściwości tribologiczne czy mechaniczne materiałów [4].

Głównym celem prezentowanych badań było badanie nowych beta-fazowych stopów i kompozytów na bazie tytanu z dodatkiem grafitu i węgla tytanu. Badania wskazują na wpływ modyfikatorów na strukturę i właściwości kompozytów na bazie tytanu, szczególnie na ich charakterystyki tribologiczne.

Materiały i metodyka badań

Próbki wykonane były metodą metalurgii proszków. Na podstawie literatury wybrano dwa pierwiastki stabilizujące fazę β tytanu – molibden i niob. Zaprojektowano beta-fazowy stop tytanu o składzie Ti-15Mo-2,8Nb. Badano także kompozyty na bazie tytanu z dodatkiem 10%obj. grafitu i dodatkiem 10%obj. węgla tytanu. Proces technologiczny obejmował prasowanie na zimno pod ciśnieniem 500 MPa i spiekanie w próżni w temperaturze 1230°C przez 3 godziny. Próbki chłodzone były do temperatury otoczenia wewnątrz pieca. Mikrostruktury próbek po tarcu badane były przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego Hitachi S-3000N. Twardość mierzona była metodą Brinella. Badania

TRIBOLOGICAL PROPERTIES OF SINTERED TITANIUM ALLOYS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

PIOTR DEPTUŁA

BIAŁYSTOK TECHNICAL UNIVERSITY,
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING,
45C WIEJSKA STREET, 15-351 BIAŁYSTOK, POLAND,
MAILTO: JRD@PB.EDU.PL

[Engineering of Biomaterials, 99-101,(2010),102-104]

Introduction

Over the past years increasing demands made by modern medicine for biomaterials induce development of new technological solutions which could allow to obtain materials better fulfilling the demands. Titanium and its alloys are considered to be the most prospective metallic biomaterials due to the unique combination of good mechanical properties and biocompatibility in human tissue environment. Titanium and its alloys are widely used in biomedical applications, e.g. in manufacture of reconstructive elements for fixing of bone fragments, prosthetic implants, and joint endoprostheses [1-4].

The use of titanium alloys as bearing surfaces in total human replacements is limited by very poor tribological properties and wear resistance. Numerous research are focused on modification of titanium tribological properties mainly by means of surface engineering methods, like ion implantation, nitriding processes and deposition of thin wear resistance coatings. However, the long term observation of implants with surface treated friction elements showed the danger of local damage and delamination of hard layer which intensified materials wear and might cause necessity of revision surgery [5,6]. Because of their properties, plastic forming and machining of titanium alloys are very difficult and that is why new technologies have been sought which would offer new possibilities to obtain more competitive titanium-based alloys and composites for biomedical application. Furthermore, modern technologies allow for creating composite materials with a wide range of fillers which improve tribological or mechanical properties of materials [4].

The main goal of the present investigation was to research the new beta-phase alloy and composite materials based on titanium powder with the addition of graphite and titanium carbide. This study examined the influence of modifiers on the structure and functional properties of titanium composites, especially their tribological characteristics.

Materials and method

Specimens were fabricated by means of powder metallurgy method. On the basis of literature the two types of β stabilizers – molybdenum and niobium were selected. Ti-15Mo-2,8Nb alloy was designed. Specimens were fabricated by means of powder metallurgy. The composite materials based on titanium powder with 10% volume fraction of graphite (Ti+C) as well as 10% volume fraction of titanium carbide (Ti+TiC) were also investigated. The technological process comprised cold pressing by the pressure of 500 MPa and sintering in vacuum at the temperature 1230°C for 3 hours. The specimens were cooled down naturally to the ambient temperature inside the furnace. The microstructure after tribological test of the alloys and composite materials was observed under a scanning electron microscope Hitachi

tribologiczne przeprowadzone były na tribometrze typu pin-on-disc. Współczynnik tarcia mierzony był przy maksymalnej wartości siły tarcia. Przeciwną były krążki ze stopu Ti-6Al-4V. Testy przeprowadzone były w środowisku wody destylowanej, w temperaturze pokojowej.

Wyniki i dyskusja

Po spiekaniu wypraski stopu z molibdenem i niobem i kompozyty z grafitem i węglikiem tytanu charakteryzowały się dobrą zagęszczalnością. Gęstość względna wyprasek otrzymanych kompozytów wynosiła w granicach 83%, co można wytłumaczyć dobrymi właściwościami smarnymi dodatków podczas prasowania. Największą zagęszczalnością po spiekaniu charakteryzował się kompozyt z grafitem – 93%. Wskazuje to na aktywowaną temperaturą reakcją pomiędzy osnową i dodatkiem podczas spiekania. Gęstość względna stopu i kompozytu z dodatkiem węglika tytanu była mniejsza.

Wyniki badań twardości Brinella jak także mikrotwardości wskazują, że twardość kompozytu Ti - grafit spiekane go w temperaturze 1230°C jest zbliżona do twardości stali węglowej (TABELA 1). Twardość czystego tytanu i stopu beta-fazowego była znacząco niższa.

Porównanie współczynników tarcia badanych materiałów przedstawiono na RYS.1. Analiza otrzymanych wyników wskazuje, że otrzymany stop miał podobny współczynnik tarcia jak stop handlowy. Kompozyty charakteryzowały się niższymi współczynnikami tarcia i wyższą odpornością na zużycie. Współczynnik tarcia kompozytów z dodatkiem grafitu był prawie dwa razy mniejszy niż próbek z czystego tytanu. Opory ruchu były także niskie dla kompozytu z dodatkiem węglika tytanu, ale w mniejszym stopniu niż dla kompozytów z grafitem.

Jest to istotna zaleta dla takich materiałów, daje to możliwość zastosowania ich jako pary tarcio we urządzeniach biomedycznych. Widoczny był wpływ wypełniacza na zużycie. W przypadku kompozytu z grafitem zaobserwowano spadek, a w przypadku kompozytu z dodatkiem węglika

S-3000N. Hardness was measured by Brinell method.

The tribological tests were performed by pin-on-disc tribometer. Friction coefficient were calculated from the maximum values of friction force to describe extreme resistances to motion. The counterspecimen in the form of a ring was made of Ti-6Al-4V alloy. Tribological tests were carried out in distillation water environment in room temperature.

Results and discussion

The green specimens of alloy with molybdenum and vanadium, and composites with graphite and titanium carbide addition before sintering were characterized by good compactibility. The relative density of received composites molders was about 83%, that could be explained by good lubricating effect of graphite during compaction process. The biggest compactibility after sintering has material with graphite addition – 93%. It indicates the possibility of thermally activated reaction between components during sintering. The relative density of alloy and composite with titanium carbide was minor in any case.

The results of macrohardness measured by Brinell method as well as the average microhardness of material showed that the macrohardness of titanium-graphite composites sintered under 1230°C was similar to the high-carbon normalized steel (TABLE 1). Macrohardness of pure titanium and beta-phase titanium alloy were significant lower.

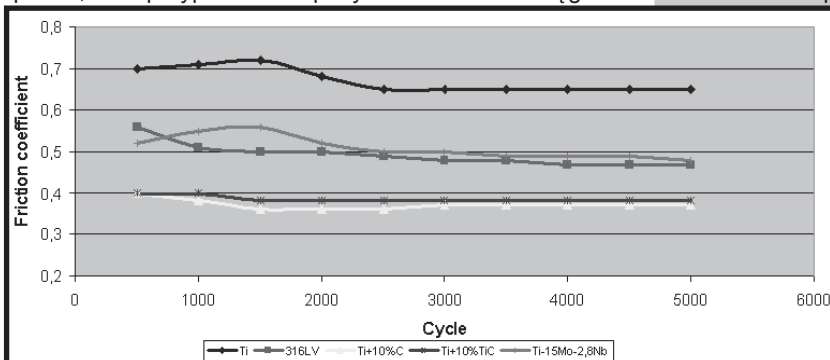
A comparison of the friction coefficient values for the investigated materials are shown in FIG.1. The analysis of obtained results confirmed that the obtained Ti-15Mo-2,8Nb alloy has similar friction coefficient to commercial alloys. Composites were characterized by a lower coefficient of friction and higher tribological wear resistance.

The friction coefficients for the composites with graphite reduced over twice compared with friction of pure titanium samples. Motion resistance are also lower for composites with titanium carbide, although to a lesser degree than in case of composites with graphite.

It is an important feature of this kind of implant materials as regards capabilities of applying them in friction nodes of biomedical devices.

Significant influence of fillers on volume of wear is apparent. In case of Ti+C decrease and in case of Ti+TiC composites increase of wear was observed (TABLE 2). One should underline advantageous influence of graphite addition on decrease of motion resistance and wear obtained composited, which will have a meaning in technical aspects.

Less advantageous tribological characteristics of Ti+TiC composites is caused through less cohesion of this type of materials and connected with this demolition might intensification of secondary wear processes. Confirmation of this was the observation of friction surfaces of



RYS.1. Porównanie współczynników tarcia otrzymanych materiałów
FIG.1 Comparison of the friction coefficient for the investigated materials

TABELA 1. Wyniki pomiarów zagęszczalności i twardości spiekanych materiałów
TABLE 1. Results of density and hardness measurements for sintered materials

Sample	Relative density [%]	Hardness HB
Pure Ti	86	120
Ti_15Mo-2,8Nb	87	166
Ti+C	91	220
Ti+TiC	87	203

TABELA 2. Wyniki pomiarów zużycia
TABLE 2. Results of wear test

Sample	Wear loos	
	Linear wear [μm]	Weight wear [•10 ⁻³ g]
Pure titanium	30,4	21,5
Ti-15Mo-2,8Nb	28,8	20,0
Ti + 10% C	16,6	11,5
Ti + 10% TiC	33,9	23,7

tytanu podwyższenie zużycia (TABELA 2). Świadczy to o znacząco korzystnym wpływie grafitu na opory ruchu i zużycie otrzymanych kompozytów, co może mieć znaczenie w technicznym aspekcie. Słabsze charakterystyki kompozytu Ti+TiC są spowodowane gorszą spójnością tego typu materiałów i odrywaniem się twardych cząstek TiC. Niszczenie to może intensyfikować procesy zużycia wtórnego. Potwierdzeniem tego była obserwacja powierzchni tarcia próbek. Na RYS.2 przedstawiono ślady tarcia badanych próbek.

Można zaobserwować, że dominowało zużycie ściernie i zmęczeniowe z deformacjami i łuszczeniem. W przypadku próbki Ti+TiC cząstki wypełniacza są luźno związane z podłożem. To może intensyfikować procesy tarcia. Otrzymane wyniki wskazują, że najlepsze właściwości posiada kompozyt z grafitem.

Spójność faz powstałych z reakcji pomiędzy cząstkami tytanu dodatków ma istotne znaczenie na gęstość i właściwości kompozytów.

Wnioski

Przedstawione badania pokazują, że metalurgia proszków daje możliwość otrzymywania nowych, interesujących materiałów do zastosowań biomedycznych. Wyniki załączonych badań wskazują, że technologia metalurgii proszków daje możliwość tworzenia stopów bogatych w fazę beta, bez toksycznych dodatków aluminium i wanadu i kompozytów na bazie tytanu. Kompozyty na bazie tytanu z dodatkiem grafitu posiadają złożoną strukturę, będącą wynikiem reakcji pomiędzy tytanem i wypełniaczem podczas spiekania.

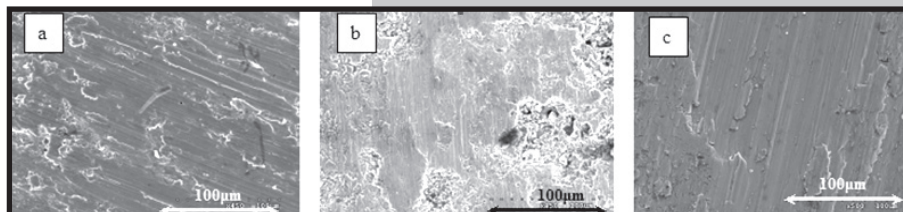
Obecność na granicy ziarn węglików wtórnych ma korzystny wpływ na właściwości tribologiczne kompozytów na bazie tytanu. Dodatek grafitu zmienia warunki tarcia i znacząco wpływa na obniżenie oporów ruchu i zużycia podczas tarcia. Kompozyt z dodatkiem grafitu miał najkorzystniejsze właściwości spośród badanych materiałów, co wskazała dobra zagęszczalność jak i poprawa właściwości tribologicznych w stosunku do materiału niemodyfikowanego. Otrzymano materiał o lepszych właściwościach mechanicznych i tribologicznych w porównaniu do materiałów standardowych.

Podziękowania

Praca finansowana w ramach projektu no. 15 0117 10

Piśmiennictwo

- [1]. Katti K.: Biomaterials in total hip replacement, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 39 (2004), s. 133-142.
- [2]. Kohn D.H.: Metals in medical applications. Current Opinion in Solid State and Materials Science (1998): 309-316.
- [3]. Long M., Rack H.J.: Review: Titanium alloys in total joint replacement - a materials science perspective. Biomaterials 19 (1998): 1621-1639.



RYS.2. Materiały po badaniach tarcowych (SEM): a) Ti + 10%C, b) Ti + 10%TiC, c) Ti-15Mo-2,8Nb

FIG.2. Materials after tribological test (SEM): a) Ti + 10%C, b) Ti + 10%TiC, c) Ti-15Mo-2,8Nb

samples after friction. On the FIG.2 the trails of investigated samples are shown. We can see, that the abra-

sive and

fatigue wear is dominated with apparent of deformation areas and spalling of surface layer friction surfaces. In case of Ti+TiC sample small particles of filler loosely connected with surface is apparent. This might cause intensification of wear processes. Obtained results are testified better compatibility and more advantageous mechanical properties for Ti+C composites.

Attendance of reactive phases between titanium and graphite particles advantageous influence on cohesion and properties this type of composites.

Conclusion

The recent research showed that powder metallurgy method offers the possibility of producing new interesting materials for biomedical applications. The results of the conducted studies indicate that powder metallurgy procedures allow to manufacture implant alloys rich in the β phase – without toxic additions of aluminum or vanadium and composite materials based on titanium. Composite materials on the basis of titanium with graphite additions have a compound structure as result of reaction between the titanium and modifier during sintering process.

Additionally, the presence of titanium carbide particles, appearing in-situ, have a good influence on tribological properties of titanium based composite materials.

The graphite addition changed the friction conditions and ensured a significant decrease of the motion resistance and wear during friction. The composite has the best properties among the researched materials, which was proved by good material condensation as well as improvement of tribological properties in comparison with non-modified material. We obtained a materials with significantly better mechanical and tribological properties in comparison to commercial alloys.

Acknowledgements

This work was supported by the State Committee for Scientific Research (no. 15 0117 10).

References

- [4]. Bylica A., Sieniawski J.: Tytan i jego stopy. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, 1985
- [5]. Liu X., Chu P.K., Ding C.: Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. Materials Science and Engineering R7 (2004): 49-121.
- [6]. Alman D. E., Hawk J. A.: The abrasive wear sintered titanium matrix-ceramic particle reinforced composites, Wear 225-229 (1999), pp. 629-639

ENZYMATYCZNA MINERALIZACJA HYDROŻELÓW GLIKOLU KATECHOLO- POLYETYLENOWEGO (cPEG) W ZASTOSOWANIACH JAKO KOSTNY MATERIAŁ ZASTĘPCZY

T.E.L. DOUGLAS^{1*}, P.B. MESSERSMITH², J.A. JANSEN¹,
S.C.G. LEEUWENBURGH¹

¹DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,
Radboud University Medical Center Nijmegen,
P.O. Box 9101, 6500 HB Nijmegen, Holandia,

²DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING,
Chemistry of Life Processes Institute,
and Institute for Bionanotechnology in Medicine,
Northwestern University, Evanston, IL 60208, USA.

*MAILTO: T.DOUGLAS@DENT.UMCN.NL

Strzeszczenie

Fosfataza alkaliczna (ALP), enzym odgrywający rolę w mineralizacji kości, został związany wewnątrz kleistego hydrożelu chemicznie zbliżonego do białek omulków, składającego się z glikolu katechoło-polyetylenowego (cPEG). Następnie, przygotowane hydrożele zostały zanurzone w roztworze glicerofosforanu wapniowego (CaGP) w celu ich zmineralizowania i poprzez to polepszenia ich przydatności jako materiał zastępczy kości. Związany ALP zachował swoją bioaktywność i przyczynił się do tworzenia materiału podobnego do apatyty wewnątrz cPEG-żelów. Ilość tego materiału oraz wytrzymałość mechaniczna wzrastały zarówno wraz ze zwiększeniem okresu inkubacyjnego jak i stężenia fosfatazy. Wyniki pokazują zasadę działania mineralizacji za pośrednictwem fosfatazy ALP.

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 105-106]

Wstęp

Hydrożel przypominający białka omulków, składający się z czteroramiennego glikolu polyetylenowego (PEG), podstawowego grupami katecholowymi, zwanego PEG-iem katecholowym (PEG), znalazł zastosowanie jako klej tkankowy i wykazał dobrą zgodność biologiczną z naturalną tkanką (1). Fosfataza alkaliczna (ALP) jest enzymem sprzyjającym mineralizacji kości poprzez swoją zdolność do odrywania biologicznie związanego fosforanu. Przyczyniając się do jednorodnej mineralizacji hydrożelów, ALP zwiększa ich wytrzymałość mechaniczną tudzież polepsza ich przydatność jako materiały zastępcze kości. Zastosowanie ALP przedstawia godną uwagi alternatywę dla innych metod, jak np. techniki wprowadzania do hydrożelu cząsteczek fosforanu wapniowego (CaP) której wada jest skłonność CaP do tworzenia agregatów. W naszych badaniach ALP został związany w cPEG podczas tworzenia żelu aby następnie spowodować jego mineralizację poprzez zanurzenie w wodnym roztworze glicerofosforanu wapniowego, źródła wapnia i fosforanu.

Metodyka

Czteroramienny cPEG został zsyntezowany jak w poprzedniej publikacji (2). Zmieszano 200 mg/ml cPEG w 2x

ENZYMATIC MINERALIZATION OF CATECHOL-POLYETHYLENE GLYCOL (cPEG) HYDROGELS FOR BONE REPLACEMENT APPLICATIONS

T.E.L. DOUGLAS^{1*}, P.B. MESSERSMITH², J.A. JANSEN¹,
S.C.G. LEEUWENBURGH¹

¹DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,
Radboud University Medical Center Nijmegen,
P.O. Box 9101, 6500 HB Nijmegen, Holandia,

²DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING,
Chemistry of Life Processes Institute,
and Institute for Bionanotechnology in Medicine,
Northwestern University, Evanston, IL 60208, USA.

*MAILTO: T.DOUGLAS@DENT.UMCN.NL

Abstract

Alkaline Phosphatase (ALP), an enzyme involved in mineralization of bone, was incorporated into mussel protein-inspired adhesive hydrogels consisting of catechol-polyethylene glycol (cPEG) and incubated in calcium glycerophosphate (CaGP) solution to induce their mineralization with a view to improving their suitability as materials for bone replacement. Incorporated ALP retained its bioactivity and induced formation of apatite-like material within cPEG gels which rose with increasing incubation time and ALP concentration, as well as an increase in mechanical strength. The results prove the principle of ALP-mediated enzymatic mineralization.

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 105-106]

Introduction

A mussel protein-inspired adhesive hydrogel consisting of 4-armed polyethylene glycol (PEG) substituted with catechol end-groups, or catechol-PEG (PEG) has been used as an tissue adhesive and shown good biocompatibility (1). Alkaline Phosphatase (ALP) is an enzyme involved in mineralization of bone by cleavage of phosphate from organic phosphate. The use of ALP to induce homogenous mineralization of hydrogels to increase their mechanical strength or render them more suitable for bone replacement applications is an alternative to, for example, incorporation of calcium phosphate (CaP) particles, which tend to aggregate. In this study, ALP was incorporated into cPEG during gel formation in order to induce gel mineralization through incubation in aqueous calcium glycerophosphate (CaGP) solution, which served as a calcium and phosphate source

Materials and methods

4-arm cPEG was prepared as described previously (2). 200 mg/ml cPEG in 2x phosphate buffered saline (PBS), ALP in 2x PBS and 0.08 M NaIO₄ (crosslinker) in H₂O were mixed in the volumetric ratio 1:1:2. Resulting gels were mineralized by incubation in 0.1M calcium glycerophosphate (CaGP) in H₂O for 1-8 days with daily medium change. The solid weight percentage, i.e. the gel weight percentage not consisting of water, was calculated as: (weight after incubation and subsequent freeze-drying/weight before incubation)•100.

zburowanym roztworze solnym fosforanu (PBS), ALP w 2x PBS i 0.08 M NaIO₄ (crosslinker) w H₂O stosunkach objętościowych 1:1:2. Powstające żele zostały poddane działaniu 0.1M wodnym roztworze glicerofosforanu wapniowego (CaGP) w przeciągu 1-8 dni w celu mineralizacji. Roztwór był wymieniany codziennie. Waga procentowa materiału stałego, to znaczy nie zawierającego wody, wyliczyła się w następujący sposób: (waga po mineralizacji i następującej liofilizacji/ waga przed mineralizacją)•100. Mineral utworzony wewnątrz cPEG-żelów zawierających ALP analizowano FTIR po uprzednim zniszczeniu składnika organicznego cPEG czterotygodniowym płukaniem w 1.25M NaOH.

Wyniki i dyskusja

Żele zawierające ALP wykazywały wysoki stopień zmineralizowania, widoczny we wzroście mętności (RYS.1). Analiza mineralu utworzonego w cPEG-żelach zawierających ALP za pomocą FTIR (RYS.2) wykazała pik przy 1030 cm⁻¹ oraz podwójny pik między 600 a 520 cm⁻¹, charakterystyczny dla apatytu. Oszacowanie wagi procentowej materiału stałego w żelach (RYS.3) unaocznio zwiększenie jego ilości jako funkcji rosnącego okresu inkubacji w roztworze glicerofosforanu wapniowego oraz wzrastającego stężenia ALP.

Podsumowanie i perspektywy

Badania przedstawiają praktyczną metodę wywołania krystalizacji mineralu podobnego do apatytu w cPEG-hydrożelach za pomocą związanego w trakcie powstawania żelu ALP i następującej mineralizacji w roztworze glicerofosforanu wapniowego. Przyszłe badania skupią się na charakteryzacji właściwości mechanicznych oraz zgodności biologicznej zmineralizowanych żelów odnośnie ich zastosowania jako kostny materiał zastępczy oraz na związaniu ALP wewnątrz innych materiałów hydrożelowych istotnych dla inżynierii tkankowej.

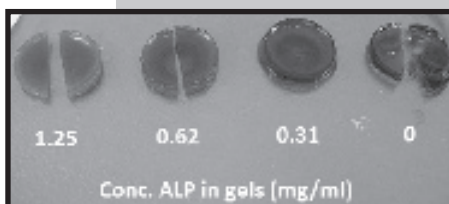
Podziękowanie

Badania zostały sfinansowane z programu "Samogojące Materiały" organizacji SenterNovem.

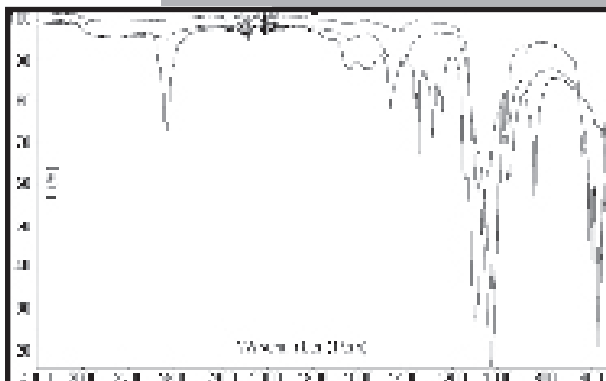
Piśmiennictwo

(1) Bilic G et al. Am J Obstet Gynecol. 2010 Jan;202(1):85.e1-9.

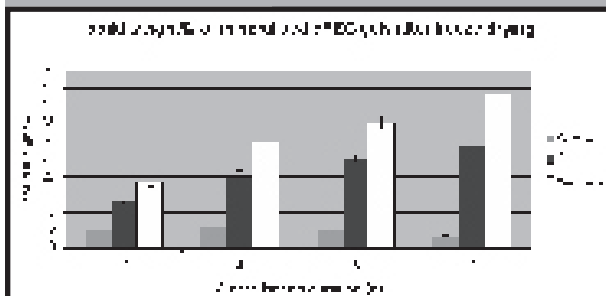
Mineral formed in cPEG gels containing ALP was examined by FTIR after destruction of the cPEG component by 4 week incubation in 1.25M NaOH.



RYS.1. 50 mg/ml cPEG-hydrożele zawierające ALP po 7 dniach w roztworze 0.1M CaGP (aq)
FIGURE 1. 50 mg/ml cPEG hydrogels containing ALP incubated for 7 d in 0.1 M CaGP (aq)



RYS.2. Widmo FTIR cPEG-a (czarny) i cPEG-a zawierającego ALP zmineralizowanego w 0.1 M CaGP (aq) i zanurzonego w 1.25M NaOH w celu wyizolowania mineralu (niebieski). Hydroksyapatyt (czerwony) jest pokazany dla porównywania.
FIGURE 2. FTIR spectra of cPEG (black) and cPEG containing ALP, mineralized in 0.1M CaGP (aq) then incubated in 1.25M NaOH to isolate mineral (blue). Hydroxyapatite (red) is shown for comparison.



RYS.3. Proporcja masy stałej cPEG-żelów zawierających 0, 1.25 lub 2.5 mg/ml ALP zmineralizowanych przez 2-8 dni w 0.1M CaGP (aq). Proporcja masy stałej wzrasta z wzrastającym okresem inkubacyjnym oraz zawartości ALP.
FIGURE 3. Solid weight percentage of cPEG gels containing 0, 1.25 or 2.5 mg/ml ALP incubated for 2-8 days in 0.1M CaGP. Weight % increases with incubation time and ALP content.

Results and discussion

Gels containing ALP mineralized, resulting in an increase in opacity (FIGURE 1). Analysis of mineral formed in cPEG gels containing ALP by FTIR (FIGURE 2) revealed a peak at approximately 1030 cm⁻¹ and a double peak between 600 and 520 cm⁻¹, both characteristic of apatite. Calculation of solid weight percentage of gels (FIGURE 3) showed that mass fraction due to mineral deposition increased with increasing ALP content and duration of incubation in CaGP solution.

Summary and outlook

This work showed the feasibility of inducing apatite-like mineral formation in cPEG hydrogels by incorporation of ALP during hydrogel formation and subsequent incubation in CaGP solution. Future work will concentrate on characterisation of mechanical properties and biocompatibility of mineralized gels with a view to their future use as bone substitutes, as well as the incorporation of ALP in other hydrogel materials of relevance for tissue engineering.

(1) Bilic G et al. Am J Obstet Gynecol. 2010 Jan;202(1):85.e1-9.

(2) Lee BP et al. Biomacromolecules. 2002;3(5):1038-47.

Acknowledgements

The authors thank the SenterNovem (NL) Self-Healing Materials program for financial support.

References

(2) Lee BP et al. Biomacromolecules. 2002;3(5):1038-47.

CYTOTOXICITY OF THE NEW BIODEGRADABLE POLYLACTIDE FIBRES FOR TISSUE REPAIR AND REGENERATION

B.ŻYWICKA¹, E.ZACZYŃSKA², A.CZARNY²,
K.TWAROWSKA-SCHMIDT³

¹MEDICAL UNIVERSITY, WROCLAW, POLAND,

²INSTITUTE OF IMMUNOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPY, WROCLAW, POLAND,

³INSTITUTE OF BIOPOLYMERS AND CHEMICAL FIBRES, LODZ, POLAND

[*Engineering of Biomaterials*, 99-101,(2010),107-108]

Introduction

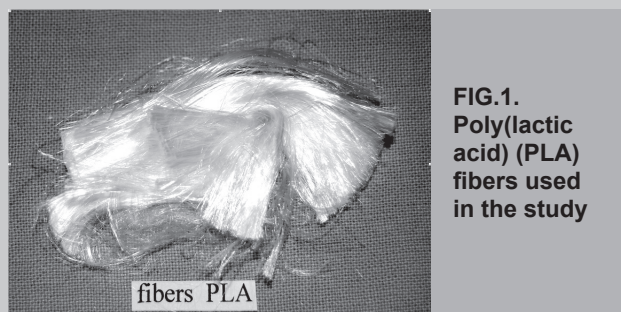


FIG.1.
Poly(lactic acid) (PLA)
fibers used
in the study

There is still a need for new polymeric materials for tissue repair and repair [1,2].

Poly(lactic acid) (PLA) is a linear aliphatic thermoplastic polyester derived from 100% renewable sources such as corn. The polymer is used broadly in textile applications.

PLA fibres meet the requirements of nonwovens sector for hygiene and medical application.

PLA fiber is compostable. The natural tissues are supported by fibrous structure, therefore fibrous biodegradable PLA fibres with controlled structure, molecular weights may be promising materials for regenerative medicine. This paper reports on the cytotoxicity evaluation of a new PLA fibers.

Materials and methods

The PLA fibres were prepared by a two-step melt-spinning process using a laboratory units at Institute of Biopolymer and Chemical Fibres (Lodz, Poland). The PLA polymer used in this study is NatureWorks Polymer 6201D, fiber grade polymer with nominal MFI=15-30 g/10min, a NatureWorks LLC product. During spinning PLA fiber is coated with Estesol PF 790, a spin-finish supplied by Bozzetto GmbH. The oil pick-up is 0.62%.

After drawing and cutting process the fibres with linear density 2,3 dtex, tenacity 35 cN/tex, elongation 44% were obtained.

Cytotoxicity Test

Cell cultures L929 (ATCC CCL1) was used for the cytotoxicity study in vitro. The mouse fibroblast-like cell line was maintained in Eagle's medium with 10% c.s., antibiotics (100U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin) and 2mM L-glutamine. The cells were seeded in the tubes, 1 ml of 2×10^6 cells/ml in the culture medium Eagle's and were incubated with extracts from polymers with addition of 2 % bovine serum for 24h, 48h and 72h at 37°C in the atmosphere of 5% CO₂ in air. Cell growth, morphology and viability (on the basis of exclusion of Trypan Blue Staining) were used as parameters to determine the cytotoxicity of the materials. As a control material PE HD (USP) was used as positive control- phenol.

Material	Morphology of cells	Mean cell count		Level of toxicity
		Total amount	Dead %	
Fibres PLA	No found	$9,6 \cdot 10^5$	1	0
PE HD	No found	$9,6 \cdot 10^5$	2	0
Phenol	Morphological changes	$3,1 \cdot 10^5$	100	3
L929-control cells	No found	$1,0 \cdot 10^6$	1	0

TABLE 1. Cytotoxicity activity of biomaterials on mouse fibroblast-like cells L929 after 72hours, in vitro

Results

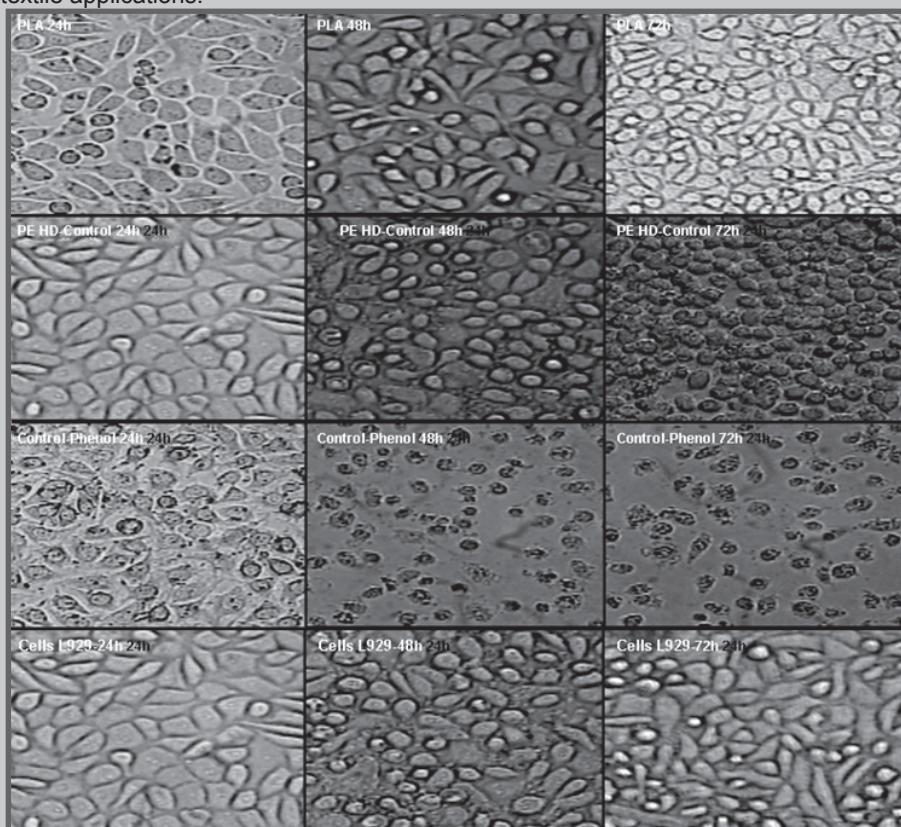


FIG.2. Morphology of L 929 fibroblastoid cell line culture after 24, 48h, 72h hours incubation with extracts from tested materials

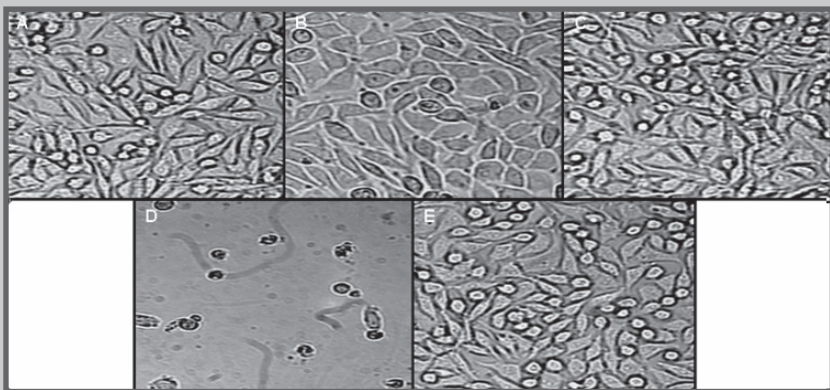


FIG.3. Morphology of L 929 fibroblastoid cell line culture after contact with copolymers (A)PLAGA, (B)BLENDAPLAGA+PHB,(C) PLAGACapr, (D)Phenol(E) Control cells

ADHESION AND GROWTH OF VASCULAR CELLS ON POROUS POLYETHYLENE TEREPHTHALATE SCAFFOLDS

JANA HAVLIKOVÁ^{1*}, KAREL TUREK², GABOR DAJKO³,
LUCIE BACAKOVÁ¹

¹CENTRE FOR CARDIOVASCULAR RESEARCH, INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC, VIDENSKÁ 1083, 142 20, PRAGUE 4-KRC, CZECH REPUBLIC

²NUCLEAR PHYSICS INSTITUTE, ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC, NA TRUHLARCE 39, 180 86, PRAGUE 8, CZECH REPUBLIC

³INSTITUTE OF NUCLEAR RESEARCH OF THE HUNGARIAN ACADEMY OF SCIENCES, H-4001 DEBRECEN, PF. 51, HUNGARY

*MAILTO: HAVLIKOVA@BIOMED.CAS.CZ

Discussion & conclusions

Cytotoxicity of new fibers from biodegradable polylactides was tested on mouse fibroblast cultures L929. No fibroblast cultures after contact with extracts from PLA fibers material showed any damage, the cells had proper morphologies and showed good proliferation in contrast to the control cells. The test results have shown that the polylactide PLA fibers are noncytotoxic and may be promising materials for regenerative medicine.

Acknowledgement

Financial support by the project „Biodegradable fibrous products”, POIG.01.03.01-00-007-/08 and EU in the frame of IE OP financed from the ERDF, is gratefully acknowledged.

Piśmiennictwo

- [1]Zaczyńska E, Żywicka B, Czarny A, Górna K, Gogolewski S: 19th ESB (2005)
- [2] Górna K, Zaczyńska E, Żywicka B, Czarny A, Gogolewski S: 26th SB (2006)

References

Abstract

Polymers such as polyethylene terephthalate (PET) have been used for large-caliber vascular prostheses with a relative success but their application is limited in small-caliber grafts. Blood vessel grafts with an internal diameter smaller than 6 mm are prone to fail mainly due to their thrombogenicity and poor haemodynamics. One of the possible solutions of these problems may be reconstruction of the tunica intima and media on the synthetic grafts. For this purpose, special PET foils were prepared. Six- μm thick foils were irradiated by copper ions or fission fragments from a radionuclide etalon source ^{252}Cf and etched by 1M sodium hydroxide to obtain holes of a defined diameter (from 80 to 100 nm in foils irradiated by copper ions and from 1.0 to 1.5 μm in foils irradiated by fission fragments) and density ($1 \times 10^6 \text{ cm}^{-2}$ - fission fragments to $5 \times 10^8 \text{ cm}^{-2}$ - copper ions) (FIG.1). Afterward these materials were seeded with vascular smooth muscle cells (VSMC) derived from the rat aorta, or endothelial cells of the line CPAE. Adhesion, proliferation and viability of the cells were monitored after one, three and seven days. The cell proliferation was evaluated by changes in the cell number in several time intervals and construction of growth curves. Determination of cell viability was based on staining of live cells with calcein emitting green fluorescence, and the dead cells with ethidium bromide emitting red fluorescence.

Experiments with the growth of vascular smooth muscle cells and endothelial cells on the PET scaffolds with different pore size showed that endothelial cells prefer pores around 1 μm while VSMC have no preferences concerning the pore size of the polymer scaffolds tested. Although the highest cell population densities were found on the glass coverslips used as control material, the number of cells growing on pristine PET did not differ from the densities on PET foils irradiated by Cu-ions or fission fragments of Cf.

The obtained data showed applicability of our improved polymer foils as supporting scaffolds for vascular cells. In the further step, these porous PET

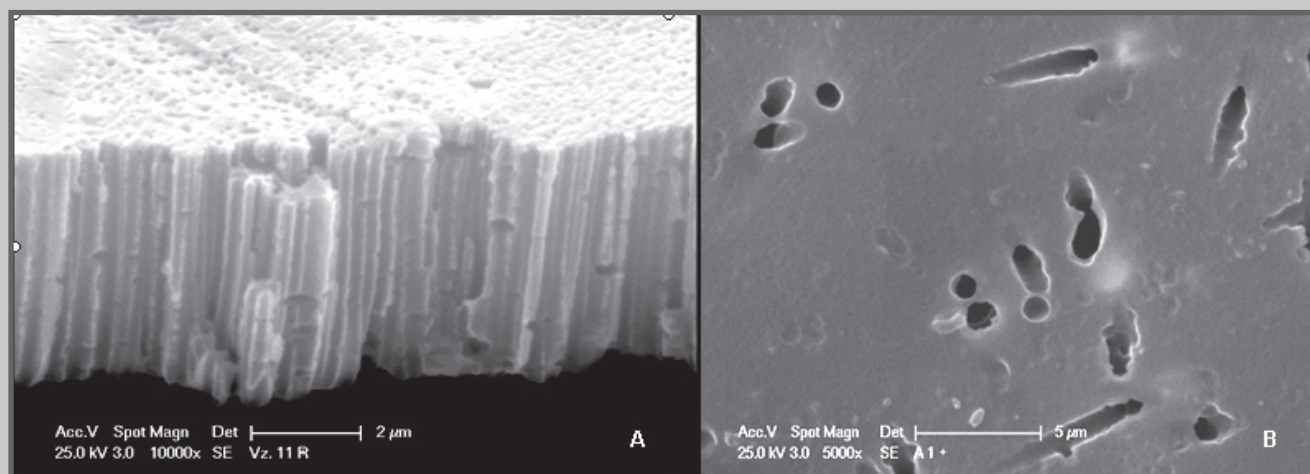


FIG.1. PET foils irradiated by Cu-ions (A) and fission fragments (B) viewed by scanning electron microscopy

membranes could serve as synthetic analogues of internal elastic lamina separating vascular smooth muscle cells and endothelial cells in a newly constructed bioartificial vascular wall.

[*Engineering of Biomaterials*, 99-101,(2010),108-109]

Acknowledgements

Supported by the Academy of Sciences of the Czech Republic (Grant No. KAN400480701) and the Grant Agency of the Czech Republic (Grants No. P108/10/1106 and 305/08/0108).

due to the oxidization and polymerization of fullerenes in an air atmosphere. We therefore tested the dependence between the age of C_{60}/Ti composites (i.e., from one week to one year) and the level of DNA damage of human osteoblast-like MG 63 cells in cultures on these materials. The DNA damage was analyzed by immunofluorescence staining of markers of DNA damage response, such as phosphorylation of histone H2AX and focal recruitment of p53-binding protein. As positive control to markers of DNA damage response was used 7 days long treatment with 2,5 mM Thymidine. We also monitored the proliferation and

FULLERENE-TITANIUM (C_{60}/Ti) COMPOSITES CAUSE NO DNA DAMAGE RESPONSE IN HUMAN OSTEOBLAST-LIKE MG 63 CELLS

IVANA KOPOVA^{1*}, LUCIE BACAKOVA¹, JIRI VACIK²,
VASILY LAVRENTIEV²

¹INSTITUTE OF PHYSIOLOGY,
ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC,
VIDENSKA 1083, 142 20, PRAGUE 4-KRC, CZECH REPUBLIC

²NUCLEAR PHYSICS INSTITUTE,
ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC,
250 68 REZ NEAR PRAGUE, CZECH REPUBLIC

*MAILTO: IVANA.KOPOVA@BIOMED.CAS.CZ

Abstract

Fullerenes (C_{60}) and fullerene-based composites are considered as promising substrates for biological cell colonization. It might be mainly due to their nanostructure, resembling the nanoarchitecture of the natural extracellular matrix. Thin films of binary C_{60}/Ti composites with various concentrations of Ti ranging from 25% (i.e., 25 Ti atoms and 75 C_{60} molecules) to 70% were deposited on microscopic glass coverslips in micro-patterned form through a metallic mask, and were tested for their potential use in bone tissue engineering. It is known that fullerenes and their derivatives can cause cytotoxic injury, cell death or inhibition of cell growth. These effects are based mainly on the reactivity of fullerenes, which may weaken with time

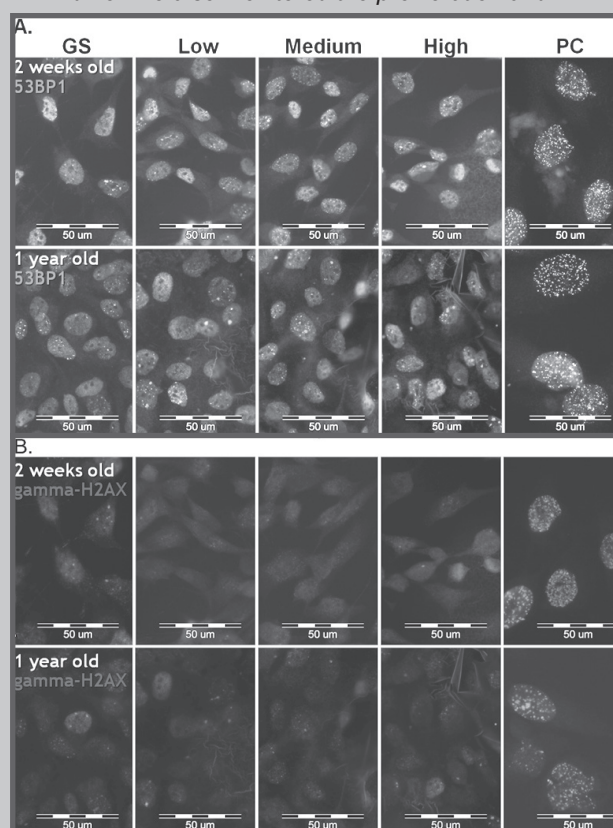


FIG.1. Immunofluorescence staining of markers of DNA damage response: 53BP1 (A) and gamma-H2AX (B) in human osteoblast-like MG 63 cells on 2 weeks old and 1 year old fullerenes with various concentrations of Ti (Low, Medium and High). GS-control microscopic glass coverslips, PC-positive control to markers of DNA damage response, 7 days long treatment with 2.5 mM Thymidine

morphological changes of the cells.

After 7 days of cultivation, we observe no cytotoxic morphological changes, such as enlarged cells or cytosolic vacuole formation, which are signs of cell senescence, and no increased induction of cell death. In addition, there was no increased level of DNA damage response on the C_{60}/Ti composites (FIG.1). We also found no significant differences in cell population densities and no increased level of DNA damage among various Ti concentrations (FIG.1). Moreover, there was no effect of the age of the C_{60}/Ti composites on the cell population densities or on the DNA damage response (FIG.1). These results suggest that fullerenes in combination with Ti do not cause cytotoxic injury and this material could be used in bone tissue engineering.

[Engineering of Biomaterials, 99-101,(2010),109-110]

Acknowledgements

This study was supported by the Academy of Sciences of the Czech Republic (Grant No. KAN400480701) and by the Grant Agency of the Czech Republic (Grant No. P108/10/1858).

BIOCOMPATIBILITY OF HYBRID FIBROUS MATERIALS BASING ON POLY-L/DL-LACTIDE

E.STODOLAK¹, A.SCISŁOWSKA-CZARNECKA², M.BŁAZEWICZ¹,
M.BOGUN³, T.MIKOŁAJCZYK³, E.MENASZEK¹

¹AGH – UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,
30 MICKIEWICZA AVE., 30-059 CRACOW, POLAND

²UNIVERSITY SCHOOL OF PHYSICAL EDUCATION,
FACULTY OF REHABILITATION, PHYSIOTHERAPY DEPARTMENT,
78 JANA PAWŁA II AVE., 31-571 CRACOW, POLAND

³TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ, FACULTY OF MATERIAL TECHNOLOGIES AND TEXTILE DESIGN, DEPARTMENT OF MAN-MADE FIBRES,
116 ŻEROMSKIEGO STR., 50-952 ŁÓDŹ, POLAND

Abstract

Hybrid biomaterials due to their unique structure may become an alternative for many popular composite and nanocomposite materials. Multilevel modification of their matrix manifesting itself in the presence of particles of different sizes i.e., micrometric, submicrometric and nanometric together with the variety of shapes of a modifying phase (nanometric fibres, submicron particles, coated nanoparticles) and its different chemical character make the hybrid materials similar to natural tissue. Bone tissue structure is particularly close to this model in which collagen fibres and hydroxyapatite particles and nanoparticles have not only different form but first of all they play different role in the tissue which depends on their chemical nature. In the biomedical engineering synthetic hybrid biomaterials are usually produced using resorbable and degradable polymer matrices and inorganic fi-

lers (ceramic bioactive particles; HAp, TCP, SiO_2) or organic fillers (collagen, polysaccharides e.g. alginate fibres). The main function of the modifying phase is improvement of the polymer matrix leading to bioactive, stronger material showing high biofunctionality.

Production of hybrid materials is based mainly on experimental works, which is related to the presence in their matrix few phases with different properties which may interact. Hybrid materials do not follow the rule of mixtures thus it is difficult to predict behaviour of a material in which co-exists different chemical and physical phases. In the work hybrid composite foils were produced in which modifying phase consisted in; nanocomposite calcium alginate fibres modified with ceramic nanoparticles; HAp (CAH fibres), TCP (CAT fibres), SiO_2 (CAS fibres) and MMT (CAM fibres). Short fibres were subjected to additional size reduction in vibration ball mill resulting in submicron and nanometric phases. Size of the particles after grinding was determined by screening analysis and DLS method (for particles smaller than 500 nm). It was observed that the population of short fibres consist in three fractions i.e.; micrometric (~2µm, 50 wt.%), submicrometric (500–800 nm, 40 wt.%) and nanometric (below 500 nm, 10 wt.%). The fibres and products of their grinding were homogenised in P(L/DL)LA polymer solution (poly-L/DL-lactide, Purarorb 80, Purac Germany). A hybrid material in the form of thin foils containing 2 wt.% of a modifying phase were subjected to durability tests consisting in incubation in distilled water (30 days/37°C). Monitoring of the medium pH and conductivity did not show changes related to harmful products of their decomposition. Osteoblast-like cells from MG-63 line contacted with the surface of the materials showed high viability (MMT test) comparable with the reference material (TCPS). High degree of adherence of the cells to the material surface (CV test) testifies of potential abilities of the material stimulating proliferation of bone tissue cells. The highest rate of dynamic growth (increase of the cells number after 7 days of incubation) was observed for the material which was modified with CAS fibres and products of their grinding. The performed investigations have a preliminary character. Their results testify for potential osteoconductive or osteoinductive abilities of hybrid materials basing on P(L/DL)LA and alginate nanocomposite fibres.

[Engineering of Biomaterials, 100-101, (2010), 110]

Acknowledgements

This work was supported by The Ministry of Science and Higher Education, grant No. N507 401 939

POTENCJAŁY CIEPLNE INICJUJĄCE SIŁĘ LORENZA W BUDOWIE STRUKTUR PRZESTRZENNYCH O ZASTOSOWANIACH MEDYCZNYCH

MARIUSZ WÓJCIK

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA IM. STANISŁAWA STASZICA
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIALOWEJ I CERAMIKI
KATEDRA BIOMATERIALÓW
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

Streszczenie

W artykule pokazano, że pewne funkcjonalne struktury krzemianowe wytwarzane w naturalnych warunkach otoczenia przez jednokomórkowce jak np. okrzemki mogą inspirować naukowców w pracach badawczych mających na celu wytworzenie w warunkach laboratoryjnych materiałów opartych na krzemionkowych matrycach polimerowych dla zastosowań medycznych jako nanoporowate materiały na nośniki substancji aktywnych biologicznie lub biosensory, a także w biotechnologii i ochronie środowiska. Odkryto, że potencjał cieplny reakcji chemicznej hydrolizy tetraetoksylanu TEOS inicjuje siłę Lorenza, która jest z kolei siłą napędową dla tworzenia jednolitej uporządkowanej struktury krzemianowej w matrycy polimerowej. Odkrycie tego mechanizmu opisano po raz pierwszy formalizmem matematycznym otrzymując rozwiązanie dające pewne możliwości sterowania kinetyką procesu formowania struktury krzemianowej o kontrolowanych parametrach rozkładu i wielkości porów wymaganych dla kontrolowanego uwalniania leków.

Słowa kluczowe: potencjał cieplny, siła Lorenza, TEOS, krzemionkowe matryce polimerowe,
[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 111-117]

Wstęp

Jest rzeczą fascynującą, że budowa struktur zarówno najdrobniejszych, jednokomórkowych organizmów żywych jak i skomplikowanych struktur tkanek zwierząt i roślin odbywa się w przyrodzie w warunkach temperatur i ciśnień otoczenia. Dziełem pracy sił natury jest zawsze charakterystyczna nano i mikroporowata struktura materii, potrzebna dla celów transportu i magazynowania energii dla przeżycia. Te struktury są z jednej strony bardzo twarde i wytrzymałe a z drugiej miękkie i elastyczne. Obserwacje przyrody pozwalają badaczom dostrzec, poznać a czasem i wydrzeć naturze tylko niewielkie tajemnice dotyczące zasad powstawania i wzrostu struktur tkanek organizmów żywych. Podejmują wtedy próby wytworzenia takich struktur, zazwyczaj materiału w postaci kompozytu, w warunkach laboratoryjnych, o właściwościach najbliższych naturalnym tkankom takim jak na przykład tkanka kostna, tkanka włókien ścięgni, tkanka ścian żył i tętnic. Wydarcie tajemnicy naturze i wytworzenie przez człowieka takiej struktury zawsze uważane jest za odkrycie naukowe.

Ilustracją tych rozważań niech będą kształty i struktury krzemianowe szkielecików mikroskopijnych okrzemek [a], które pobierają z wody morskiej krzem oraz tlen, tworzą

THERMAL POTENTIAL INITIATING LORENTZ'S FORCE IN FORMATION OF SPATIAL STRUCTURE FOR MEDICAL APPLICATION

MARIUSZ WÓJCIK

AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
FACULTY OF MATERIAL SCIENCE AND CERAMICS
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS
30 MICKIEWICZA AVE. 30-059 CRACOW, POLAND

Abstract

In article was showed, that some functional silica structures produced in natural conditions by unicellulars as for instance the diatoms can inspire scientists in his research works having on aim the production of materials in laboratory conditions based on silica polymer matrix for medical application as nanoporous carriers materials for substances with biological activity as well as in biotechnology and environment protection as biosensors. It was discovered, that the thermal potential of hydrolysis reaction of the tetraetoxysilan (TEOS) initiates the Lorenz's force that is the driving force for creating an uniform and well ordered silica structure in polymer matrix. The discovery of a mechanism was described firstly by the mathematical formalism receiving the solution giving some possibilities for steering the kinetics of the process of formation silica structure with controlled parameters of distribution and size of porous required for controlled release of therapeutic agents.

Keywords: thermal potential, Lorentz force, TEOS, silica polymer matrix.

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 111-117]

Introduction

It is the fascinating thing, that building of structures of the smallest, unicellular alive organisms as well as compiled structures of the animals and plants tissues take place in surroundings conditions of temperatures and pressure in nature. The characteristic nano and micro porous structure of a matter is always the work of the force labor of a nature necessary for transportation and energy storing for survival. These structures are very hard and resistant from one side and soft and elastic from the second. The observations of nature permit the explorers to perceive, to get to know and sometimes to wrest a small secret from the nature relating the principles of formation and the growth of structures of tissues of alive organisms. They undertake tests of producing such structures of material in laboratory conditions, usually complicated composites, characterizing with proprieties closest to natural tissues such for instance the osseous tissue, tissue of filaments of tendon, tissue of walls of strands and the arteries. Extortion of a secret of nature and producing by man such a structure is always considered as a scientific discovery.

Let an illustration of these considerations will be the structures and shapes of skeletons of microscopical diatoms [a]. They take the silicon and oxygen from sea water and create the silica and they construct small boxes to keep in them the chlorophyll. Moreover they produced an oily substance

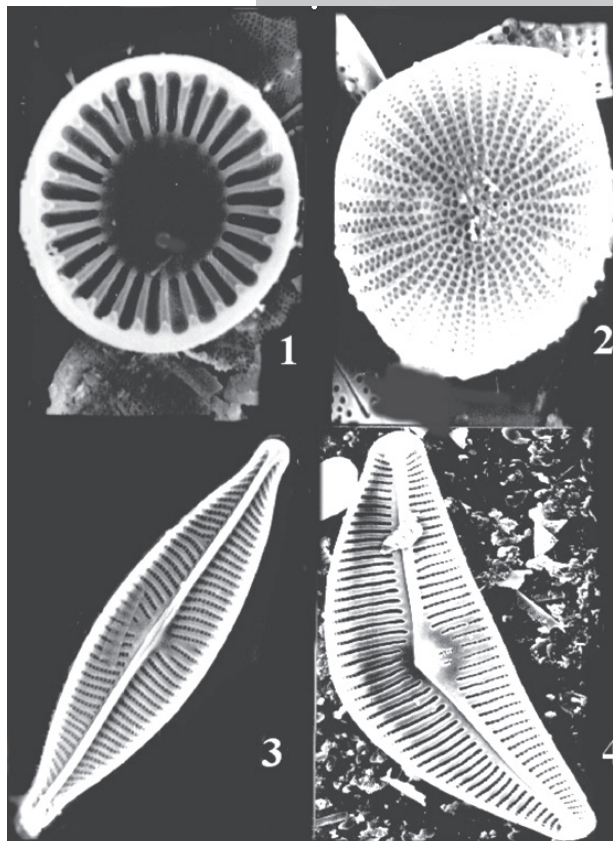
krzemionkę i budują z niej maleńkie pudełeczka aby przechowywać w nich chlorofil i ponadto dzięki wytworzonej substancji olejistej utrzymywać się na wodzie aby spełnić przede wszystkim tą pierwszą funkcję (RYS.1).

Ich szkliste osłonki mają zadziwiająco różnorodne kształty - są kolistę, kwadratowe, trójkątne, owalne, prostokątne, zawsze bogato ozdobione ornamentami geometrycznymi. Te filigranowe wzory po mistrzowsku wyryte w przezroczystej krzemionce są tak drobne, że włos ludzki zmieściłby się między nimi jedynie wtedy, gdyby był 400 razy cieńszy. Promienice budują krzemionkowe twory przypominające słońce z promieniami długich cienkich przezroczystych igiełek wystających z centralnie położonej kryształowej kulki lub z krzemionkowych rozpórek zbudowane są sześciokąty, z których powstają proste kopuły geodezyjne. Ale jedna geodezyjna kopuła nie wystarcza temu superarchitektowi, ponieważ musi on mieć trzy koronkowo zdobione krzemionkowe czasze, umieszczone jedna w drugiej. Gąbki budują bardzo skomplikowane szkielety krzemionkowe. W naturze rozpoznają się nawzajem, dzięki czemu mogą łączyć się i organizować. Mikroskopijne komórki mogą współpracować ze sobą, żeby wydzielić miliony przypominających szkło igiełek i zbudować tak złożoną kratownicę.

Opisane wyżej bogactwo i funkcjonalność naturalnych krzemionkowych struktur o symetrycznych geometrycznych formach jest wzorcem i znakomitą inspiracją do naśladowania dla badaczy w celu poszukiwania nowych materiałów o zastosowaniach technicznych, a zwłaszcza medycznych, w tym szczególnie interesujące są materiały nadające się na nośniki środków aktywnych biologicznie [c], [d], [e], [f], w biotechnologii i ochronie środowiska jako biosensory [g], [h].

Zasadniczym problemem jest zaprojektowanie, biodegradowalnej matrycy (nośnik) pozbawionej własnej aktywności farmakologicznej, w której zostanie umieszczona substancja aktywna w sposób zapewniający kontrolowanie jej uwalniania wg określonej kinetyki. Natura ma takie materiały, chociażby wspomniane okrzemki magazynujące chlorofil. Powstaje pytanie czy takie formy można wytworzyć w warunkach laboratoryjnych naśladowując te naturalne i jaką zastosować technikę? Obserwowany szybki rozwój inżynierii, w szczególności w obszarach związanych z syntezą nowych materiałów nano-porowatych metodą zol-żel wydaje się iż daje pozytywną odpowiedź na powyższe pytanie. Umożliwia ona otrzymywanie materiałów nieorganicznych, organicznie-nieorganicznych, nanokompozytów w bezpiecznych warunkach procesowych nie niszczących funkcji biologicznych biomolekuł, np. enzymów [i], [j].

Podstawą metody zol-żel jest otrzymanie żelu z zolu, który powstaje w wyniku reakcji hydrolizy i kondensacji prekursora metalu, np. tetraetoksylanu (TEOS). Metoda daje duże możliwości praktyczne dla wytworzenia porowatych materiałów krzemionkowych o strukturze nieuporządkowanej takich jak kserożele lub aerożele oraz uporządkowanej



RYS.1. Formy struktur przestrzennych mikroskopijnych okrzemek w elektronowym mikroskopie skaningowym (Centrales 1, 2; Pennales 3, 4) [b].
FIGURE 1. Forms of spatial structures of microscopic diatoms in scanning electronic microscope (Centrales 1,2, Pennales 3,4) [b].

to keep a head on the sea water and first of all thanks to that they fulfill the first function (FIGURE 1).

They have a glassy sheaths with surprisingly various shapes as circular, square, triangular, oval, rectangular. They are always richly decorated with geometrical ornaments. These filigree ornamentation pattern engraved in a masterly manner in transparent silica are so small that human hair would hold between them only when it will be of 400 times thinner.

Actinomycetales construct silica creatures reminding sun with long rays and thin transparent needles growing from the crystal sphere which is centrally positioned or hexagons made from silica spacers which come into being the straight geodesy copulas. However one geodesy copula does not suffice for this super architects because it must to have three lacily adorned silica bowls which are placed all alike.

Sponges construct compiled silica skeletons. They

was recognized mutually in the nature and thanks to that they can join and to organize. Microscopical cells can co-operate together in order to liberate millions needles reminding glass and they build complicated lattice-work.

The wealth and the functionality of natural silica structures with symmetrical geometrical forms described above are a patterns and excellent inspiration for mimicry by researchers to search of new materials with technical as well as especially medical application where materials for drug and biologically active substances carriers are particularly interesting [c], [d], [e], [f], and also in biotechnology and environment protection as biosensors [g], [h].

The principal problem is designing of the biodegraded matrix (solid carrier) without own pharmacological activity where will be inserted an active substance in such a way that assure the controlled release of the drug according to definite kinetics. Nature has such materials, let's remember diatoms storing chlorophyll. Question comes into being if such forms can be produced in laboratory conditions copying these natural ones and what techniques should be applied? The observed quick development of engineering, in peculiarity in areas connected with synthesis of new nano porous materials by the sol- gel method seems that it gives the positive answer on above mentioned question. It makes possible to produce the inorganic as well as organic nano composite materials in safe processing conditions of not destructive functions for biological molecules (enzymes) [i], [j].

The basis of sol-gel method is the receipt a gel from the sol which comes into being as a result of reaction of hydrolysis and the condensation of a precursor of metal, for instance tetraetoksylan (TEOS). Method gives a large practical possibilities for producing not ordered silica porous

w skali nanometrycznej, których przykładem są siła molekularne o heksagonalnie uporządkowanej strukturze (M41S, MCM41) (RYS.2), regularnym uporządkowaniu (MCM48) czy warstwowym (MCM50) oraz mezoporowate pianki komórkowe (MCF). Produkt w postaci proszku charakteryzuje się bardzo wąskim rozkładem objętości porów o średnicy kilku nanometrów, powierzchni właściwej rzędu $1000\text{m}^2/\text{g}$, objętości porów około $1\text{cm}^3/\text{g}$ [k].

Wyniki dotychczasowych prac wskazują, że podstawowe znaczenie dla zaprojektowania krzemionkowej matrycy mogącej znaleźć zastosowanie w kontrolowanym uwalnianiu substancji aktywnych biologicznie mają jej właściwości strukturalne, które zależą od użytego prekursora krzemu, stosunku molowego wody do prekursora krzemu, modyfi-

katorów, typu i rodzaju katalizatora, itp. Modyfikacja struktury matrycy krzemionkowej otrzymanej metodą zol-żel możliwa jest w ograniczonym zakresie, poprzez jej syntezę w oparciu o mieszane nieorganiczno-organiczne prekursorzy krzemu, dodanie rozpuszczalnych w zolu polimerów, itp. Kontrolowane uwalnianie substancji aktywnej następuje głównie w wyniku procesów erozyjnych i degradacyjnych, jakim ulega nośnik oraz zjawisku dyfuzji. Mobilność cieczy w porach jest zdecydowanie mniejsza od tej obserwowanej w roztworze, a zatem jest możliwe, kontrolowanie do

pewnego stopnia uwalniania substancji leczniczej z nośnika porowatego, poprzez zmiany jego parametrów strukturalnych takich jak średnica porów, powierzchnia właściwa, objętość porów. Pojawia się tu ważny problem sterowania budową struktury matrycy jako nośnika substancji leczącej dopasowanej do rodzaju tego leku i jego sposobu dawkowania zgodnego z kinetyką uwalniania leku przyjętą przez lekarza leczącego.

Innym interesującym rodzajem materiałów, które mogą znaleźć zastosowanie jako nośniki substancji biologicznie aktywnych, a oprócz tego w technice adsorpcji, separacji, nośników katalizatorów a także magazynowaniu energii są uporządkowane mezoporowate struktury węgla (OMCs) [m], [n]. Materiały te również charakteryzują się ściśle zdefiniowaną geometrią jednakowej wielkości porów w dużym zakresie od 2 do 50nm, dużą powierzchnią właściwą i dużą objętością porów. Znałe do tej pory różne metody otrzymywania tych materiałów pozwalają na uzyskanie struktur o wysokim stopniu uporządkowania porów i różnej morfologii, jak formy kuliste, włókniste, formy z pustymi przestrzeniami, ale uprzywilejowane zastosowanie mają jednak formy kuliste. Ogólne, najprostsze podejście dla wytworzenia uporządkowanych mezoporowatych struktur węgla polega na chemicznej lub fizycznej aktywacji prekursorów węgla czyli na wytworzeniu trwałej matrycy krzemianowej o uporządkowanej strukturze mezoporów, wielokrotnie powtarzanej impregnacji za pomocą prekursorów węgla takich jak sacharoza, alkohol furfurylowy, etylen, następnie wysuszeniu, karbonizacji i usunięciu matrycy krzemionkowej. Uzyskane struktury węgla są odwrotną repliką struktury krzemianowej.

Literatura przedmiotu podaje bardzo liczne procedury otrzymywania mezoporowatych struktur węgla. Zauważa się przy tym, iż brak jest opisów i podejścia teoretycznego do zagadnienia, które umożliwi wyłonienie parametrów dla sterowania procesem wytwarzania matrycy krzemianowej, od której zależeć będzie wielkość porów i uporządkowanie późniejszych struktur węgla. Przewidywanie i uzyskanie

structure as xerogels or aero gels as well as well ordered silica structures in the nanometer scale as for example molecular sieves with hexagonal well ordered structure (M41S, MCM41) (FIGURE 2), cubic settlement (MCM48) or stratified (MCM50) mesoporous cellular foams (MCF). Powder product characterizes with a very narrow distribution of pores volume where diameter of pores are about several nanometer and a proper surface is in range of $1000\text{m}^2/\text{g}$, and pores volume is about $1\text{cm}^3/\text{g}$ [k].

The results of hitherto exist works show, that the structural properties have a basic meaning for designing silica matrix for application in controlled release of an active biologically substances. Structural properties depend from used precursor of silicon, molar relation of water to precursor of silicon,

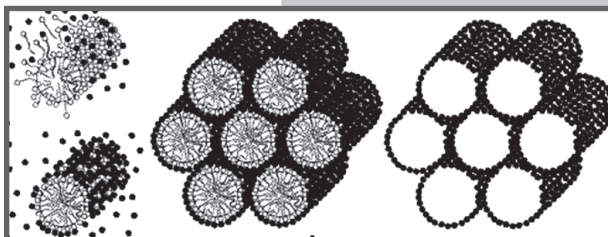
modifiers, type and a kind of catalyst, and etc. Modification of structure of silica matrix obtained by the sol-gel methods is possible in the limited range by its synthesis based on an organic as well as inorganic precursors also with addition of polymers which is soluble in sol. The controlled release of drugs active substance follows mainly as a result of an erosive and degradation processes of the carrier as well as the phenomenon of diffusion. The mobility of liquid in pores is decidedly smaller

from that observed in solution, and therefore it is possible on controlling, to sure stage, the release of the healing substance from porous carrier. It can be done by change of structural parameters as porous diameter, specific surface and porous volume. Here appears an important problem concerning the steering of the formation of matrix structure of a drug carrier which is well-fitting to the kind of a medicine and a way of dosage corresponding with kinetics of release of the medicine accepted by doctor treatment.

Other interesting kind of materials which can find an application as a drug carriers as well as in adsorption, separation, catalysts carriers and materials for energy storing are an ordered mesoporous structure of carbon (OMCs) [m], [n]. These materials also characterized with closely defined geometry of uniform size of pores in a great range from 2 to 50nm, high proper surface and large volume of pores.

Well known methods for production these materials allow to make a structure with very high ordered pores and different morphology as spherical forms, fibrous, moulds with empty spaces but only spherical ones have privileged application up to present time. In general, the simplest approach for producing the well ordered mesoporous structures of carbons depends on chemical or physical activation of the carbon precursors that is on the production of hard template of silica matrix with ordered structure of mesoporous, many time repeated impregnation by the aim of carbon precursors such sucrose, alcohol furfurylowy, ethylene and then drying, carbonization and the removal the silica matrix. The obtained carbon structures are a replica of silica structures.

The literature shows numerous procedures of receiving the mesoporous structures of carbon. It is noticed, that is lack of descriptions and theoretical approach to the question which will make possible the appearing of parameters for steering the process of production of silica matrix from which it will depend on the size of pores distribution the later structures of carbon. Expectation and obtainment of the planed and controlled pores size and their shapes in



RYS.2 Schemat powstawania uporządkowanych materiałów mezoporowatych z krzemionką o strukturze heksagonalnej przy użyciu organicznej matrycy [I].

RYS.2 Schema of formation of ordered mesoporous silica hexagonal structure in polymeric matrix [I].

założonej i kontrolowanej wielkości porów i ich kształtów w skali nanometrycznej jest obecnie kolejnym krytycznym problemem technologicznym.

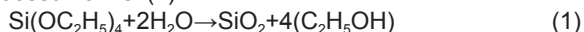
W niniejszym artykule podjęto po raz pierwszy próbę podania teoretycznego opisu zagadnienia, stanowiącego odkrycie mechanizmu tworzenia i wzrostu matrycy krzemianowej oraz podanie matematycznej funkcji opisującej proces. Podstawą jest wykorzystanie potencjału cieplnego reakcji hydrolizy TEOS, związku o lokalnych właściwościach hydrofobowych i hydrofilowych, w wyniku której zostaje zainicjowany ruch reagujących substratów. Rozpisanie operatora przyspieszenia wylania członów tzw. siły Lorentza. Siła ta, jak można pokazać, ma składowe ortogonalne do płaszczyzny ruchu wywołanego gradientem temperatur zależnego od potencjału cieplnego reakcji hydrolizy tetraetoksylanu. Ta ortogonalna składowa przenosi, przy udziale odpowiednich potencjałów, jony krzemu w kierunku ortogonalnym do płaszczyzny powodując powstawanie struktury zgodnej z formą przestrzenną polimerowej matrycy.

Główny wynik

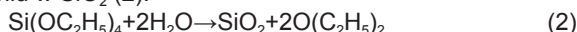
Rozpoznanie zagadnienia tworzenia nanostruktur o osnowie krzemianowej na bazie formalizmu matematycznego prowadzić może do opanowania procesu sterowania ich konstrukcjami. Dlatego przedstawimy ideę.

Rozważmy quasi-płaską tetraedryczną strukturę tetraetoksylanu (TEOS) o formule chemicznej $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ składającej się z lokalnych polarnie czterech grup etylenowych, otaczających anion krzemu (RYS.3). Grupy etylenowe tworzą cztery podobszary hydrofobowe, natomiast pośrodku położony krzem stanowi podobszar hydrofilny.

Alternatywnie TEOS może być uważany za ester etylowy kwasu ortokrzemowego $\text{Si}(\text{OH})_4$. Dzięki reaktywności wiązań Si-OR jest on stosowany głównie jako czynnik sieciujący w polimerach krzemianowych lub jako prekursor dwutlenku krzemu przy produkcji półprzewodników i w wytwarzaniu aerożeli. Bardzo łatwo ulega konwersji do dwutlenku krzemu po dodaniu wody. Reakcja biegnie poprzez serie kondensacji przekształcając cząsteczkę TEOS w stały minerał poprzez tworzenie wiązań Si-O-Si. Podobszary hydrofobowe odsuwają się na osiach (tutaj poziomych i pionowych). Ta reakcja hydrolizy jest właśnie przykładem wspomnianego procesu zol-żel (1).



Szybkość konwersji do dwutlenku krzemu zależy od obecności zasadowego lub kwasowego katalizatora. W temperaturach powyżej 600°C , TEOS ulega przekształceniu w SiO_2 (2).



Na RYSUNKU 4 pokazano dla przykładu dwa wybrane zdjęcia z filmu przedstawiającego proces hydrolizy TEOS i tworzenia się krzemionki. Strzałki pokazują kierunki ruchu rotacyjnego powstałych samoistnie dwóch obszarów powstawania krzemionki. Potencjały cieplne reakcji hydrolizy wytwarzają odpowiedni gradient temperatury, a oddziałując na materię tworzą podobszary o różnej gęstości i wpływają na hydrofilne sytuacje dla podobszarów krzemowych i hydrofobowe dla podobszarów grup etylenowych. Dodając do tego układu jonowe związki powierzchniowo czynne

nanometer scale is the next critical technological problem at present time.

In presented article, at first time, was shown the test of theoretical description of the question, making up the discovery of mechanism of creating and growth of silica matrix as well as the mathematical function describing the process have been revealed. Thermal potential of hydrolysis reaction of TEOS possesses locally hydrophobic as well as hydrophilic properties is basis of this theory. It initiates movement of reacting substrates in result. Writing out the operator of acceleration it appears the link of Lorentz's force. As it can be shown, Lorentz's force has orthogonal components into the plane of movement made by temperature gradient dependent on the gradient of the thermal potential of hydrolysis reaction of TEOS. This orthogonal component transfers ions of silicon in orthogonal direction into the plane, using suitable potentials, causing the formation of structure which is concordant with spatial form of polymer matrix.

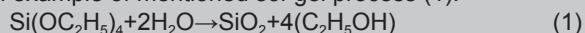
Main result

Recognition of the problem of creating of nanostructure with silica matrix on the base of mathematic formalism can lead to master of the process of steering their construction. Therefore the idea will be revealed.

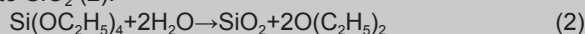
Let's consider the quasi flat tetrahedral structure of TEOS with chemical formula $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ consisting from locally polar four ethylene groups, surrounding the silicon anion (FIGURE 3). Ethylene groups create four hydrophobic subarea, however silicon placed in the middle creates hydrophilic one.

Alternatively TEOS can be consider as an ethylene ester of the orthosilicate acid $\text{Si}(\text{OH})_4$. Thanks to the reactivity of the bonds of Si-OR it can be applied as the netting factor in the silica polymers or the precursor of the dioxide in production semiconductors as well as in the production the aero gels. It very easy undergoes the conversion

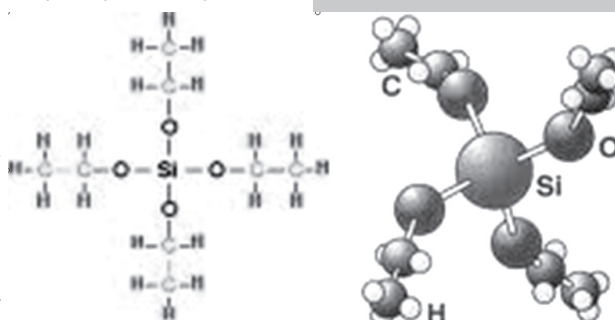
into silicon dioxide after an addition of the water. Reaction runs across series of condensation transforming corpuscle of TEOS in solid mineral by creating bonds of Si-O-Si. Hydrophobic subarea move away on axis (here horizontal and perpendicular). This hydrolysis reaction of hydrolysis is just an example of mentioned sol-gel process (1).



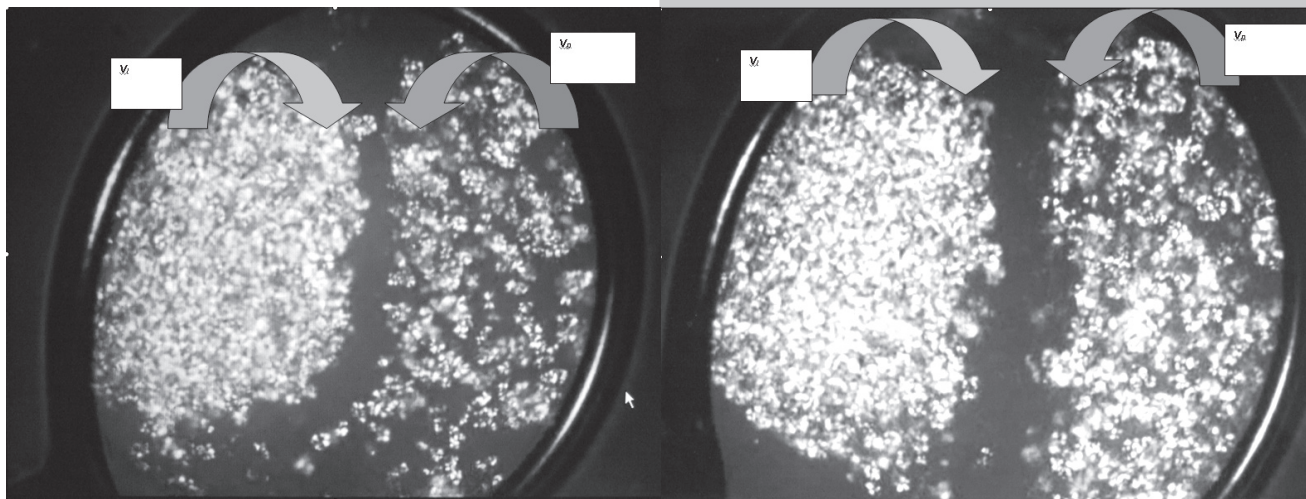
The speed of conversion into silicon dioxide depends on the presence of an alkaline or acidic catalyst. In temperatures above 600°C , TEOS undergoes transformation into SiO_2 (2).



Two pictures taking from the sequences of individual recordings are an example of illustration of the hydrolysis process of TEOS and formations of silicon dioxide (FIGURE 4). The arrows show directions of the rotary movement of the two areas of the formation of silicon dioxide which have been created self dependently. The thermal potentials of hydrolysis reaction create the suitable gradient of temperature, and affecting on the matter make subareas with different density and influence on the hydrophilic situation for silicon subareas and hydrophobic ones for ethylene groups. Adding ionic surfactants in alkali conditions such as for instance block copolymers of oxide alkenes with



RYS.3 Schemat struktury tetraetoksylanu (TEOS) o formule chemicznej $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ [o]
FIG.3 Schema of Structure of tetraethoxysilane (TEOS) with chemical formula $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ [o]



RYS.4 Ilustracja reakcji hydrolizy TEOS i kierunku rotacji powstałej krzemionki na początku (u góry) i na końcu obserwacji (na dole) ($v_{\text{lewy podobszar}} < v_{\text{prawy podobszar}}$) [p]

FIG.4. Illustration of hydrolysis reaction of TEOS and directions of rotation of formed silica in the beginning (top) and end (down) of observation ($v_{\text{left subarea}} < v_{\text{right subarea}}$) [p]

w warunkach zasadowych, takie jak na przykład blokowe kopolimery tlenków alkenów o długich łańcuchach polietylenowych i polipropylenowych, można otrzymać właściwe materiały mezoporowate np. typu MCM. Agregaty tych związków tworzą szablonowy struktur porów. Elektrostatyczne oddziaływanie pomiędzy dodatnio naładowanym związkiem powierzchniowo czynnym a ujemnie naładowanymi cząsteczkami krzemu jest procesem formowania tych materiałów. W tym miejscu zwrócimy uwagę na fakt, że równanie ciągłości w sytuacji gęstości materiału określonego potencjałem cieplnym reakcji hydrolizy wymusza pewien ruch o określonej prędkości.

Przeanalizujemy teraz drogi tego transportu, wobec egzotermicznej reakcji w prostym układzie TEOS – woda. Proces zachodzi w układzie cylindrycznym (ρ -promień, ϕ -kąt, z -kierunek osi). W chwili początkowej rozważamy niewielki odcinek Δz na osi z . Załóżmy, że płyn, poddany jest siłom związanym z równaniem dynamiki Eulera, które przybliża opis naszego zjawiska. Równanie to ma postać (3):

$$\frac{\partial v}{\partial t} + \nabla \frac{v^2}{2} - v \times \text{rot} v = -g \frac{\nabla p}{\gamma} \quad (3)$$

gdzie:

v – pole prędkości

g – przyspieszenie ziemskie

p – ciśnienie

γ – gęstość

Ponieważ dla każdego płaskiego podobszaru sytuacja energetyczna zjawiska jest identyczna możemy założyć, że pochodna czasowa pola prędkości jest zerem, ponieważ proces jest stacjonarny. Ponadto zjawisko zachodzi powoli, a więc możemy też założyć że gradient energii kinetycznej zjawiska jest nieduży. Dostajemy zatem do rozwiązania równanie postaci (4):

$$v \times \text{rot} v = g \frac{\nabla p}{\gamma} \quad (4)$$

gdzie: $v \times \text{rot} v$ – siła Lorentza

Zapiszmy pola w układzie cylindrycznym. Mamy (5):

$$v = e_{\rho} v_{\rho} + e_{\phi} v_{\phi} + e_z v_z \quad (5)$$

long polyethylene and polypropylene chains it is possible to produce mesoporous materials type MCM. Aggregates of these compounds make templates of pores structure. Electrostatic reaction between positively charged surfactant and negatively charged corpuscles of silicon belong to the process of formation of these materials.

It will turn the attention on fact in this place, that the equation of continuity in situation of the density of material described by thermal potential of hydrolysis reaction force some movement with a definite velocity.

We will analyze the way of this transportation now, in relation to the exothermic reaction in a simple system TEOS-water. The process proceed in cylindrical configuration where ρ -radius, ϕ -angle, z -direction of axis. In initial moment we consider small section Δz on axis z . Let's put on, that liquid is subjected with potency connected with Euler's equation of dynamics, which brings closer description of our phenomenon. Equation this has FIGURE (3):

$$\frac{\partial v}{\partial t} + \nabla \frac{v^2}{2} - v \times \text{rot} v = -g \frac{\nabla p}{\gamma} \quad (3)$$

where:

v - velocity field

g - earthly acceleration

p - pressure

γ - density

We can assume that time derivative of velocity field is equal zero because for every flat subarea the energetic situation of phenomenon is identical and process is stationary. Moreover phenomenon proceed slowly, so we can put also that the gradient of kinetic energy of phenomenon is small. We receive therefore the following equation for solution (4):

$$v \times \text{rot} v = g \frac{\nabla p}{\gamma} \quad (4)$$

where: $v \times \text{rot} v$ - Lorentz's force

Let's record it in cylindrical configuration. We have (5):

$$v = e_{\rho} v_{\rho} + e_{\phi} v_{\phi} + e_z v_z \quad (5)$$

oraz (6):

$$\text{rot}v = e_\rho \left(\frac{1}{\rho} \frac{\partial v_z}{\partial \varphi} - \frac{\partial v_\varphi}{\partial z} \right) + e_\varphi \left(\frac{\partial v_\rho}{\partial z} - \frac{\partial v_z}{\partial \rho} \right) + e_z \left(\frac{\partial(\rho v_\varphi)}{\partial \rho} - \frac{1}{\rho} \frac{\partial v_\rho}{\partial \varphi} \right)$$

Przeanalizujmy te wektory, z punktu widzenia zjawiska. Ze względu na przybliżenie radialne i obserwowaną formę ruchu, pochodne względem kąta przyjmujemy za równe zero.

Ze względu na powtarzalność struktury względem osi z przyjmujemy pochodne w tym kierunku też za przybliżone zerem. Wobec tego dostaniemy (7):

$$v \times \text{rot}v = -e_z v_\rho \frac{\partial v_z}{\partial \rho} - e_\varphi v_\rho \left(\rho \frac{\partial v_\varphi}{\partial z} + v_\varphi \right) + e_\rho [v_\varphi \left(\rho \frac{\partial v_\varphi}{\partial z} + v_\varphi \right) - v \frac{\partial v_z}{\partial \rho}]$$

Emisja ciepła z reakcji hydrolizy wytwarza odpowiedni gradient temperatury, który wymusza odpowiedni ruch radialny, który jest dobrze obserwowany na płaszczyźnie poziomej zgodnie z równaniem ciągłości. Pomińmy składową v_ρ ze względu na ograniczenie ścianką naczynia reakcyjnego i napiszmy równanie ruchu w postaci (8):

$$v_\varphi \left(\rho \frac{\partial v_\varphi}{\partial z} + v_\varphi \right) - v_z \frac{\partial v_z}{\partial \rho} = f(\rho) \quad (8)$$

Równanie to opisuje składową z-tową siły Lorentza unoszącej krzemionkę z hydrolitycznego rozkładu TEOS. Ta siła właśnie buduje strukturę krzemionkową i jeśli zastosuje się odpowiedni związek powierzchniowo czynny, to otrzymamy struktury heksagonalną lub regularną lub warstwową charakteryzujące się wysokim uporządkowaniem struktury. Jest też wielce prawdopodobne, iż siła Lorentza ulega dodatkowemu wzmocnieniu z uwagi na specyficzny rozkład i wielkość ładunku elektrostatycznego związku powierzchniowo czynnego wynikającego z długości jego łańcucha polietylenowego i polipropylenowego.

Zaprojektowanie i otrzymanie materiału o celowych właściwościach jako nośniki substancji aktywnych biologicznie, z żadaną kinetyką uwalniania leku, a więc o różnych wielkościach porów i postaci (kulki, włókna, pręty) i ich rozkładzie w całej objętości materiału, będzie polegać na odpowiednim doborze takich parametrów sterujących jak temperatura, pH oraz obecność surfaktantów, czynników spęczniających, elektrolitów, soli, które charakteryzują się odpowiednim potencjałem zeta.

Podsumowanie i wnioski

Obserwacje i analizy porównawcze naturalnych struktur krzemionkowych jednokomórkowych okrzemek oraz struktur krzemianowych matryc polimerowych otrzymanych w warunkach laboratoryjnych wykazały duże podobieństwo i przyczyniły się do odkrycia mechanizmu formowania tych struktur.

Teoria formalizmu matematycznego posłużyła natomiast do opisu zjawiska i pozwoliła przyjąć wyjaśnienie, że potencjał cieplny reakcji hydrolizy inicjuje siłę Lorentza (w zapisie wektorowym $v \times \text{rot}v$), która jest z kolei siłą napędową dla tworzenia jednolitej uporządkowanej struktury krzemianowej w matrycy polimerowej.

Równanie ruchu w układzie cylindrycznym opisuje składową z-tową siły unoszącej krzemionkę z rozkładu hydrolitycznego związku chemicznego TEOS, która w obecności odpowiedniego kopolimeru odpowiada za formowanie heksagonalnej, regularnej lub warstwowej struktury krzemionki z matrycą organiczną (KMO).

and (6):

$$\text{rot}v = e_\rho \left(\frac{1}{\rho} \frac{\partial v_z}{\partial \varphi} - \frac{\partial v_\varphi}{\partial z} \right) + e_\varphi \left(\frac{\partial v_\rho}{\partial z} - \frac{\partial v_z}{\partial \rho} \right) + e_z \left(\frac{\partial(\rho v_\varphi)}{\partial \rho} - \frac{1}{\rho} \frac{\partial v_\rho}{\partial \varphi} \right)$$

Let's analyze these vectors, with point of view of phenomenon. With regard on radial approximation and observed character of movement, we will accept derivatives equal zero in relation to angle. With regard on repeatability of structure in relation to axis z we also accept derivatives approximate to zero in this direction. In relation to this we will get (7):

$$v \times \text{rot}v = -e_z v_\rho \frac{\partial v_z}{\partial \rho} - e_\varphi v_\rho \left(\rho \frac{\partial v_\varphi}{\partial z} + v_\varphi \right) + e_\rho [v_\varphi \left(\rho \frac{\partial v_\varphi}{\partial z} + v_\varphi \right) - v \frac{\partial v_z}{\partial \rho}]$$

The emission of heat from hydrolysis reaction generate a suitable gradient of temperature, which force a suitable radial movement which is observed on horizontal plane according with equation of continuity. Let's skip component v_ρ with regard on limitation of the side of reactionary vessel and let's write an equation of the movement (8):

$$v_\varphi \left(\rho \frac{\partial v_\varphi}{\partial z} + v_\varphi \right) - v_z \frac{\partial v_z}{\partial \rho} = f(\rho) \quad (8)$$

Equation describes z component of Lorenz's force carry off the silica from hydrolytic splitting of TEOS. This force just constructs the silica structure and if suitable surfactant will be applied, then we will receive the high ordered hexagonal, cubic or lamellar structures. It is also highly probable, that Lorenz's force undergoes an additional strengthening with attention on specific distribution and the quantity of an electrostatic charges from surfactant resulting with length of their polyethylene and polypropylene chains.

Designing and the production of material with intentional properties as carriers for biologically active substances with demanded kinetics of medicine release characterizing with different size of pores and morphologies as spheres, fibres, hollow spheres and their distribution in whole volume of material will depend on the appropriate selection of such steering parameters as temperature, pH as well as the presence the surfactants, compacting factors, electrolytes, salt, which characterize with adequate zeta potential.

Summary and conclusions

The observations and comparative analyses of natural unicellular silica structures of diatoms and silica polymer matrix structures produced in laboratory conditions show high similarity and contributed into discovery of a mechanism of formation of these structures.

The theory of mathematical formalism however was used to description of phenomenon and permitted to accept an explanation, that the thermal potential of hydrolysis reaction of TEOS initiates Lorenz force (in vector notation $v \times \text{rot}v$), which is the driving force for creating an uniform well ordered silica polymers structure.

Movement equation in cylindrical arrangement describes component z of force transferring silica from hydrolytic splitting of TEOS which response for hexagonal, cubic or lamellar structures of silica polymer matrix in presence of suitable copolymers (MCM).

Presented problems becomes a challenge to undertaking the co-operation of experts in material engineering as well as pharmaceutical industry and medical doctors requiring an innovatory approach to this question and corresponding financial expenses.

Przedstawiona problematyka jest wyzwaniem do podjęcia współpracy specjalistów inżynierii materiałowej oraz przemysłu farmaceutycznego i lekarzy wymagającej nowatorskiego podejścia do tego zagadnienia i odpowiednich nakładów finansowych.

Podziękowanie

Praca finansowana przez Akademię Górniczo Hutniczą w ramach prac statutowych.

Autor składa podziękowanie Prof. Michaelowi Bredolowi i studentce Joannie Micior z FH Munster University of Applied Sciences za udostępnienie dokumentu filmowego.

Acknowledgement

The work was funded by AGH University of Science and Technology in frames of statutory works.

Author thanks for Prof. Michael Bredol and student Joanna Micior from FH Munster University of Applied Sciences for facilities of movie document.

Piśmiennictwo

- [1] F.E. Round, R.M.Crawford: The Diatoms. Biology and Morphology of the Genera, Cambridge University Press, (1990)
- [2] B. Rakowska: Kosmos, t.52, nr 2-3, str. 307-314, (2003)
- [3] R.W.Baker, Controlled Release of Biologically Active Agents, John Wiley&Sons, Inc, New York, (1987)
- [4] M.Miyajima, A.Kosshika, J.Okada, M.Ikeda, J..Control. Release, 60, 199-209, (1998)
- [5] N.Clark, K.O'Connor, Z.Ramtoola, Drug Dev. Ind.Pharm., 24, 169-174, (1998)
- [6] A.M.Pacholczyk, A.P.Terzyk, M.Wisniewski, Perspectives of applicability of new carbon nanomaterials for controlled drug delivery, Wiadomości chemiczne, 64, 1-2, (2010)
- [7] Künzelmann U., Böttcher H., (1997), Sensors and Actuators B, 38-39, 222-228.
- [8] Russel S., (1990), Biotechnologia, Wyd. Naukowe PWN, 168-200, Warszawa
- [9] C.J.Brinker, G.W.Scherer, Sol-Gel Science. The Physics and Chemistry of Sol-Gel Proc., Academic Press, San Diego, (1993)

References

- [10] A.C.Pierre, Introduction to Sol-Gel Processing, Kluwer Academic Publishers, Boston, (1998)
- [11] P.Kortesuo, M.Ahola, S.Karlsson, I.Kangasniemi, A.Yli-Urpo, J.Kiesvaara, Biomaterials, 21, 193-198, (2000)
- [12] C.T.Kresge, M.E.Leonowicz, W.J.Roth, J.C.Vartuli, J.S.Beck: Nature 359, 710, (1992)
- [13] An-Hui Lu, Wen-Cui Li, W.Schmidt, E.W.Kiefer, F.Schuth, Easy synthesis of an ordered mesoporous carbon with a hexagonally packed tubular structure, Carbon 42, 2939-2948, (2004)
- [14] J.Choma, M.Jaroniec, A.Zawiślak, K.Jedynak, Adsorpcyjne właściwości nanoporowatych materiałów węglowych otrzymanych z wykorzystaniem matryc krzemionkowych i polimerowych, Ochrona Środowiska, vol.31, nr 3, (2009)
- [15] D. Bulla, Deposition of thick TEOS PECVD silicon oxide layers for integrated optical waveguide applications. Thin Solid Films, 334(1-2):60-64, (1998)
- [16] M.Bredol, J.Micior, FH Munster University of Applied Sciences – dokument filmowy, June, (2010)

WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNE POLILAKTYDU MODYFIKOWANEGO WŁÓKNAMI I CZĄSTKAMI PRZEZNACZONEGO NA GWOŹDZIE ŚRÓDSZPIKOWE

A. MORAWSKA-CHOCHÓŁ, J. CHŁOPEK, A. WIETECH

AKADEMIA GÓRNICZO – HUTNICZA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW,

Streszczenie

Praca miała na celu ocenę właściwości mechanicznych różnego typu kompozytów o podstawie z polilaktydu pod kątem ich zastosowania na wielofunkcyjne gwoździe śródszpikowe. Zastosowanie resorbowalnej osnowy pozwoli na uniknięcie powtórnej operacji w celu usunięcia implantu, natomiast stosowane dodatki mają na celu zapewnienie odpowiedniej charakterystyki mechanicznej (wzmocnienie polimeru włóknami węglowymi, z alginianu sodu i poliakrylonitrylu) i bioaktywności (ułatwienie osteointegracji przez obecność cząstek ceramicznych z trójfosforanu wapnia).

MECHANICAL PROPERTIES OF POLYLACTIDE MODIFIED WITH FIBRES AND PARTICLES FOR INTRAMEDULLARY NAILS

A. MORAWSKA-CHOCHÓŁ, J. CHŁOPEK, A. WIETECH

AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,
30 MICKIEWICZA AVE. 30-059 CRACOW, POLAND

Abstract

This paper was aimed to evaluate mechanical properties of various composites with polylactide matrix regarding their application for multifunctional intramedullary nails. Due to the presence of the resorbable matrix, there is no need to perform another operation for implant removal. And used additives are to provide the adequate mechanical characteristic (polymer reinforcement with carbon fibres, sodium alginate fibres and polyacrylonitrile fibres) and bioactivity (facilitated osseointegration due to the presence of ceramic particles with tricalcium phosphate).

Największe wzmocnienie osnowy PLDL uzyskano poprzez zastosowanie włókien węglowych. Zastosowanie włókien alginianowych zapewniło ponad 100% wzrost wytrzymałości na rozciąganie w stosunku do czystego polimeru, jest to jednak wartość nie wystarczająca na zastosowanie tego kompozytu na gwoździe śródszpikowe. Dodatek cząstek TCP w ilości 15% wag. spowodował niewielkie obniżenie wytrzymałości kompozytu. Optymalnym rozwiązaniem wydaje się być połączenie w jednym kompozycie obu typów włókien, węglowych i alginianowych, dla zapewnienia wysokiej wytrzymałości, przy równoczesnym zastosowaniu kilku procent TCP dla nadania cech bioaktywności, co będzie kontynuowane w kolejnych badaniach.

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 117-120]

Wstęp

Zespoleńia gwoździami śródszpikowymi stanowią jeden z podstawowych zabiegów w zespinalaniu kości długich, zdecydowanie wypierając zespoleńia płytkowe, a także tam gdzie nie ma złamań otwartych również stabilizatory zewnętrzne [1]. Opracowanie nowej generacji gwoździ śródszpikowych opartych o materiały resorbowalne otwiera nowe możliwości w zakresie zespinalania złamanych kości długich u zwierząt i ludzi. W Polsce od dłuższego czasu prowadzi się badania nad opracowaniem zarówno technologii otrzymywania polimerów resorbowalnych, jak i wykorzystania ich szczególnie w postaci kompozytów w medycynie [2,3,4]. Główne kierunki badań to podłoża dla inżynierii tkankowej, jak i implanty w różnej postaci stosowane głównie w chirurgii kostnej [5,6]. Wprowadzenie nowych rozwiązań materiałowych może istotnie poprawić skuteczność zespoleń i ograniczyć efekty uboczne związane z koniecznością stosowania a potem usuwania gwoździ metalicznych.

Praca miała na celu ocenę właściwości mechanicznych różnego typu kompozytów o osnowie z polilaktydu pod kątem ich zastosowania na wielofunkcyjne gwoździe śródszpikowe. Zastosowanie resorbowalnej osnowy pozwoli na uniknięcie powtórnej operacji w celu usunięcia implantu, natomiast stosowane dodatki mają na celu zapewnienie odpowiedniej charakterystyki mechanicznej (wzmocnienie polimeru włóknami węglowymi, z alginianu sodu i poliakrylonitrylu) i bioaktywności (ułatwienie osteointegracji przez obecność cząstek ceramicznych z trójfosforanem wapnia).

Materiały i metody

Kopolimer L-laktydu z DL-laktydem (PLDL-70%L/30%DL) otrzymano w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrzu [7]. Polimer ten formowano metodą prasowania. Próbkę w kształcie wiosełek otrzymano w dwóch etapach. W pierwszym etapie polimer rozpuszczono w CH_2Cl_2 , a następnie wylano na szalki w celu otrzymania błonek. W drugim etapie z wysuszonych folii wycięto próbki w kształcie wiosełek, które następnie prasowano w formie w temperaturze 120°C i pod ciśnieniem 110 kPa/cm^2 .

Kompozyt PLDL z włóknami alginianowymi (PLDL+ALG) otrzymano poprzez wprowadzenie 50% wag. włókien ciągłych z alginianu sodu (średnica włókien $17 \mu\text{m}$, wytrzymałość na rozciąganie $123,6 \text{ MPa}$, wydłużenie $7,4\%$, moduł Younga $9,9 \text{ GPa}$). Włókna te otrzymano w Katedrze Włókien Sztucznych na Wydziale Inżynierii i Marketingu Tekstyliów Politechniki Łódzkiej z alginianu sodu, metodą mokrą z roztworu alkoholu.

Kompozyt PLDL z włóknami PAN (PLDL+PAN) otrzymano poprzez wprowadzenie 50% wag. włókien ciągłych PAN (średnica włókien $7,5 \mu\text{m}$, wytrzymałość na rozcią-

The most significant reinforcement of PLDL matrix was obtained by using carbon fibres. Alginate fibres provided over 100% increase in tensile strength in relation to pure polymer. But this value was not satisfactory for the application of such composites in intramedullary nails. Adding 15 wt% of TCP particles resulted in slight decrease in the composite strength. The combination of both types of fibres, carbon and alginate ones, in one composite seems to be the optimal solution supporting high strength, at simultaneous addition of a few percent of TCP to provide bioactive features of the material. This issue will be continued in further studies.

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 117-120]

Introduction

Intramedullary nails fixation is among regular procedures used for pipe bones fixations, and it is definitely replacing plate fixations as well as external supports in case of simple fractures [1]. The development of a new generation of intramedullary nails based on resorbable materials provides new opportunities for the fixation of fractured human and animal pipe bones. In Poland, the research on developing technologies of obtaining resorbable polymers and their application, especially in the form of composites, in medicine has been conducted for quite a long time [2,3,4]. The main types of studies are the base for tissue engineering as well as various forms of implants used mainly in bone surgery [5,6]. The introduction of new material solutions can significantly improve the efficacy of fixations and reduce side effects related to the use, and then removal of metal nails.

This paper was aimed to evaluate mechanical properties of various composites with polylactide matrix regarding their application for multifunctional intramedullary nails. Due to the presence of the resorbable matrix, there is no need to perform another operation for implant removal. And used additives are to provide the adequate mechanical characteristic (polymer reinforcement with carbon fibres from sodium alginate and polyacrylonitrile) and bioactivity (facilitated osseointegration due to the presence of ceramic molecules with tricalcium phosphate).

Materials and methods

L-lactide/DL-lactide co-polymer (PLDL-70%L/30%DL) was developed in the Centre of Polymer and Carbon Materials PAN in Zabrze, Poland [7]. It was formed through compressing method. The samples in the shape of paddles were obtained in two stages. At first stage, polymer was dissolved in CH_2Cl_2 , and then poured into bowls to obtain films. At second stage, the samples in the shape of paddles were cut from dried films and then, they were compressed at the temperature of 120°C at pressure of 110 kPa/cm^2 .

PLDL composite with alginate fibres (PLDL+ALG) was produced by adding 50 wt.% of long fibres from sodium alginate (fibre diameter – $17 \mu\text{m}$, tensile strength – 123.6 MPa , elongation – 7.4% , Young's modulus – 9.9 GPa). These fibres from sodium alginate were produced by wet method with alcohol solution at the Department of Man-Made Fibres, Faculty of Material Technologies and Textile Design, Technical University of Łódź.

PLDL composite with PAN fibres (PLDL+PAN) was produced by adding 50 wt.% of PAN long fibres (fibre diameter – $7.5 \mu\text{m}$, tensile strength – 284.9 MPa , elongation – 22.9% , Young's modulus – 6.95 GPa). These fibres were also obtained at the Department of Man-Made Fibres, Faculty of Material Technologies and Textile Design, Technical University of Łódź.

ganie 284,9 MPa, wydłużenie 22,9%, moduł Younga 6,95 GPa). Włókna te również otrzymano w Katedrze Włókien Sztucznych na Wydziale Inżynierii i Marketingu Tekstyliów Politechniki Łódzkiej.

Kompozyt PLDL z włóknami węglowymi (PLDL+CF) otrzymano poprzez wprowadzenie 50% wag. włókien ciągłych CF (włókna węglowe średniomodulowe T300 firmy Torayca, wytrzymałość na rozciąganie 3,2 GPa, wydłużenie 1,4%, moduł Younga 235 GPa).

Kompozyt PLDL z cząstkami TCP (PLDL+TCP) otrzymano poprzez dodatek 15% wag. cząstek β -TCP firmy Fluka (skład tlenkowy: CaO – 54,3% mas., P_2O_5 – 45,7% mas.).

Badania mechaniczne wykonano dla próbek wyjściowych i po ich inkubacji w symulowanym środowisku biologicznym na uniwersalnej maszynie wytrzymałościowej (Zwick 1435). Inkubację prowadzono w wodzie destylowanej w temperaturze 37°C przez okres 6 tygodni. Wykonano również badania mikrostrukturalne na mikroskopie stereoskopowym Beta, firmy Visio Beta.

Wyniki i dyskusja

Przeprowadzone badania mechaniczne wykazały, że największy efekt wzmocnienia uzyskano dla kompozytu modyfikowanego włóknami węglowymi (TABELA 1). Ponad 100% wzrost wytrzymałości na rozciąganie w stosunku do czystego polimeru osiągnięto dla kompozytu z alginianem sodu. W mniejszym stopniu poprawę wytrzymałości uzyskano dla kompozytu modyfikowanego włóknami PAN, natomiast dodatek cząstek fosforanu trójwapienia w niewielkim stopniu pogorszył właściwości mechaniczne polimeru. Wytrzymałość na rozciąganie włókien alginianowych wynosiła 124 MPa i była niższa od wytrzymałości włókien PAN (285 MPa), jednak większy efekt wzmocnienia w przypadku modyfikacji kompozytu włóknami alginianowymi może być związany z ich wyższym modułem Younga (9,9 GPa dla włókien alginianowych i 6,95 GPa dla włókien PAN) oraz występowaniem dodatkowych efektów podwyższających energię pęknięcia, takich jak wyciąganie włókien, co potwierdza RYS. 1. Obniżenie wytrzymałości materiału w wyniku wprowadzenia cząstek TCP jest związane z ich wysoką zawartością w kompozycie. Poprawę wytrzymałości w tego typu kompozytach można uzyskać poprzez dodatek TCP w ilości do kilku procent.

Wytrzymałość na rozciąganie badanych materiałów gwałtownie obniża się wraz z czasem inkubacji (RYS. 2). Spadek ten jest największy w przypadku kompozytu z włóknami alginianowymi, co jest spowodowane rozpuszczaniem włókien w środowisku wodnym. Stopniowa zmiana wytrzymałości następuje w przypadku kompozytów z TCP i włóknami PAN.

Pomimo wyraźnej poprawy wytrzymałości kompozytów modyfikowanych włóknami ciągłymi z alginianu sodu i PAN wciąż jest to jednak wartość niewystarczająca dla zastosowania tych kompozytów jako gwoździ śródszpikowych. Aby zmniejszyć udział włókien węglowych, na rzecz resorbowalnych włókien alginianowych przy zachowaniu dobrych parametrów mechanicznych, optymalnym rozwiązaniem wydaje się być połączenie w jednym kompozycie obu typów włókien, natomiast równoczesne zastosowanie kilku procent TCP nadałoby materiałowi właściwości bioaktywnych.

PLDL composite with carbon fibres (PLDL+CF) was produced by adding 50 wt.% of CF long fibres (medium modulus CF T300 by Torayca company, tensile strength – 3.2 GPa, elongation – 1.4%, Young's modulus – 235 GPa).

PLDL composite with TCP particles (PLDL+TCP) was obtained by adding 15 wt.% of β -TCP molecules by Fluka (oxides content: CaO – 54.3 wt.%, P_2O_5 – 45.7 wt.%).

Mechanical tests were carried out for initial samples and after their incubation period performed in the simulated biological environment on a universal testing machine (Zwick 1435). The incubation was carried out in distilled water at the temperature of 37°C for the period of 6 weeks. Also microstructure tests on Beta stereoscopic microscope by Visio Beta were conducted.

Results and discussion

The conducted mechanical tests demonstrated that the best reinforcement result was obtained for the composite modified with carbon fibres (TABLE 1). Additionally, the composite with sodium alginate showed 100% higher tensile strength in comparison with pure polymer. Not so significant increase in tensile strength was observed for the composite modified with PAN fibres, whereas the additive of tricalcium phosphate particles slightly deteriorated mechanical properties of polymer.

The tensile strength of alginate fibres was 124 MPa. This value was lower than the one for PAN fibres (285 MPa). However, better reinforcement result for composite modified with alginate fibres can be related to their higher Young's modulus (9.9 GPa for alginate fibres and 6.95 GPa for PAN fibres) and the occurrence of extra effects, such as fibres elongation, which increase the fracture

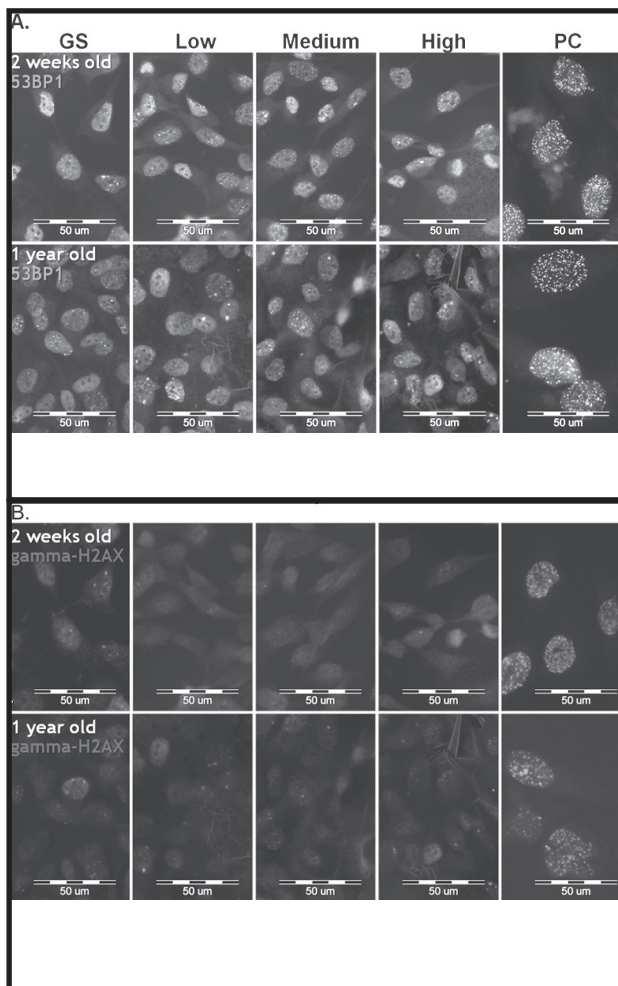
energy. This is presented in FIG. 1. The addition of TCP particles decreased the material strength. This is related to their high content in the composite. Strength of such composites can be improved by adding TCP in the quantity up to a few percent.

The tensile strength of tested materials was dramatically reduced along with the incubation time (FIG. 2). The most significant reduction can be observed in composites with alginate fibres, which is caused by fibres dissolution in the aqueous environment. The gradual change in the strength was visible for the composites containing TCP particles and PAN fibres.

Despite the evidential improvement in the strength of composites modified with sodium alginate and PAN fibres, this value is still unsatisfactory for the application of such composites in intramedullary nails. The optimal solution for reducing carbon fibres content by resorbable alginate fibres and maintaining satisfactory mechanical parameters seems to be the combination of both types of fibres in one composite. And simultaneous application of a few percent of TCP would provide bioactive features of this material.

TABELA 1. Właściwości mechaniczne polimeru PLDL i jego kompozytów.
TABLE 1. Mechanical properties of PLDL polymer and its composites.

	σ [MPa]	ϵ_{Fmax} [%]	E [GPa]
PLDL	33,2±0,9	7,4±0,9	1,4±0,1
PLDL+TCP	29,2±1,7	3,6±0,6	1,8±0,4
PLDL+ALG	74,9±3,9	13,9±2,1	3,0±0,3
PLDL+PAN	52,7±1,1	12,1±1,2	2,0±0,1
PLDL+CF	248±3,2	21,2±1,6	22,1±0,9



RYS. 1. Powierzchnie przełamu powstałe po zerwaniu próbek: a) PLDL+ALG, b) PLDL+PAN (mikroskop stereoskopowy).

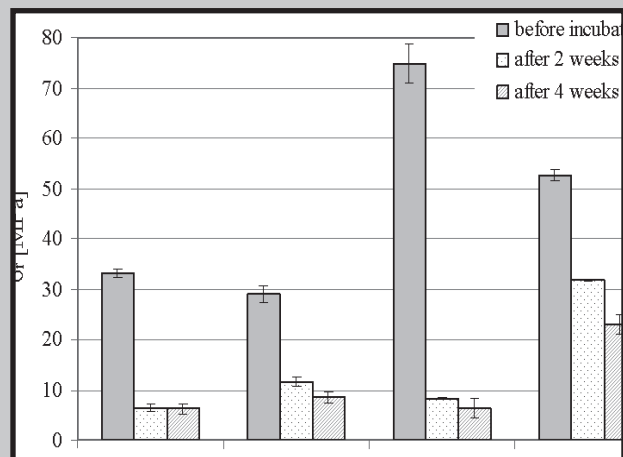
FIG. 1. Fracture surfaces formed after the following samples rupture: a) PLDL+ALG, b) PLDL+PAN (stereoscopic microscope).

Wnioski

Największe wzmocnienie osnowy PLDL uzyskano poprzez zastosowanie włókien węglowych. Zastosowanie włókien alginianowych zapewniło ponad 100% wzrost wytrzymałości na rozciąganie w stosunku do czystego polimeru, jest to jednak wartość nie wystarczająca na zastosowanie tego kompozytu na gwoździe śródszpikowe. Dodatek cząstek TCP w ilości 15% wag. spowodował niewielkie obniżenie wytrzymałości kompozytu. Optymalnym rozwiązaniem wydaje się być połączenie w jednym kompozycie obu typów włókien, węglowych i alginianowych, dla zapewnienia wysokiej wytrzymałości, przy równoczesnym zastosowaniu kilku procent TCP dla nadania cech bioaktywności, co będzie kontynuowane w kolejnych badaniach.

Podziękowania

Praca finansowana w ramach projektu badawczego Nr 4575/B/T02/2009/37, ze środków Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego.



RYS. 2. Właściwości mechaniczne polimeru PLDL i jego kompozytów w funkcji czasu inkubacji.

FIG. 2. Mechanical properties of PLDL polymer and its composites in the function of incubation time.

Conclusions

The most significant reinforcement of PLDL matrix was obtained by using carbon fibres. Alginate fibres provided over 100% increase in tensile strength in relation to pure polymer. But this value was not satisfactory for the application of such composites in intramedullary nails. Adding 15 wt.% of TCP particles resulted in slight decrease in the composite strength. The combination of both types of fibres, carbon and alginate ones, in one composite seems to be the optimal solution supporting high strength, at simultaneous addition of a few percent of TCP to provide bioactive features of the material. This issue will be continued in further studies.

Acknowledgement

This research was financially supported by the research project No 4575/B/T02/2009/37 financed by the Ministry of Science and Higher Education.

Piśmiennictwo

References

- [1] Marciniak M., Chrzanowski W., Krauze A.: Gwoździe śródszpikowe w osteosyn-tezie, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2006.
- [2] Deb S.: Synthetic and Natural Degradable Polymeric Biomaterials, in: Biomaterials Fabrication and Processing, Handbook, Chu P.K., Liu X., eds., CRC Press, Taylor & Francis Group, 2008, 457-481.
- [3] Rokkanen P.U.: Bioabsorbable Polymers for Medical Applications with an Emphasis on Orthopedic Surgery, in: Polymeric Biomaterials, Dumitriu S., ed., Second Edition, Dekker M. Inc., New York 2002, 545-562.
- [4] Chłopek J., Morawska-Chochół A., Paluszkiwicz C.: FTIR evaluation of PGLA – Carbon fibres composite behaviour under 'in vivo' conditions, Journal of Molecular Structure 875, 2008, 101-107.
- [5] Zhang P., Hong Z., Yu T., Chen X., Jing Xiabin.: In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly(L-lactide), Biomaterials 30, 1, 2009, 58-70.
- [6] Spitalny A.D.: Bioabsorbable Implants, Clinics in Podiatric Medicine and Surgery 23, 4, 2006, 673-694.
- [7] Dobrzyński P., Kasperczyk J., Janeczka H.: Synthesis of Biodegradable Copolymers with the Use of Low Toxic Zirconium Compounds. 1. Copolymerization of Glycolide with L-Lactide Initiated by Zr(Acac)₄, Macromolecules 34, 2001, 5090-5099.

POLYACRYLONITRILE PRECURSOR FIBRES CONTAINING BIOGLASS

GRZEGORZ SZPARAGA, PAULINA KRÓL, MACIEJ BOGUŃ*

DEPARTMENT OF MAN-MADE FIBRES
TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, POLAND
MAILTO: MACIEK.BOGUN@WP.PL

[*Engineering of Biomaterials*, 99-101, (2010), 121-122]

Introduction

One of the directions in which biomaterials engineering and regenerative medicine are developing today is the discovery of ever newer implant materials which would considerably shorten the body's regeneration time, and thus reduce the costs of hospitalization and rehabilitation of patients.

An alternative solution to the implants currently used in orthopaedics and traumatic surgery might be the use of composites produced with carbon fibres obtained using a new generation of polyacrylonitrile precursor fibres. The introduction of bioglass into the precursor fibres as a nanoadditive will make it possible to obtain carbon fibres or unwoven fabric whose structure contains an inorganic, biologically active compound. A convincing argument for the use of a nanoadditive of this type could be the fact that it is one of the most widely used bioceramic materials in orthopaedics [1-5]. The carbon fibres are also required, in addition to the basic biological properties, to demonstrate high strength in combination with higher porosity. Both of these parameters are directly dependent on the structure and properties of the precursor fibres. The formation of PAN fibres wet from solution makes it possible to control the process parameters suitably so as to obtain the desired properties [6-8]. Carbon fibres or unwoven fabrics obtained in this way can be used to produce composite materials also containing other biodegradable polymers, such as aliphatic polyesters. The composites so obtained will be characterized by differentiated biodegradation times, anisotropy of properties (due to the presence of fibres) and extensive possibilities in designing their porosity. Porosity, and also the nature of the surface of the ready implant, are parameters which determine how well the material introduced into the body interacts with the surrounding tissues.

The objective of the research reported here was the production of a new generation of precursor PAN fibres containing bioglass nanoadditive, and fulfilling the condition of good processability into unwoven fabric. These fabrics will be a starting product for obtaining a new type of carbon-polymer composites intended for bone tissue regeneration. This work constitutes part of a series of research on the selection of appropriate conditions for the formation of precursor PAN fibres containing bioglass nanoadditive.

Formation of PAN fibres and methods

Fibers were spun by the wet process from solution using a laboratory spinning machine that made it possible to stabilize required technological parameters under a constant

control. A spinneret with 240 orifices, 0.08 mm in diameter each, was used. Fibers were solidified in a bath containing an aqueous solution of DMF with a concentration adapted to the given spinning series under investigation. The fiber drawing process was carried out in two stages: in a plasticizing bath and under superheated steam. After rinsing the fibers were dried at 20-40°C under isothermic conditions.

Moisture content measurements at 100% RH were carried out in accordance with the Polish standard PN-71/P-04635.

Water retention (WVR) was measured by relating the weight of retained water after centrifuging a sample for 10 min at an acceleration of 10000 m·s⁻² to the weight of a dry sample. Prior to centrifuging, fibers were immersed in water containing 1% of Rokafenol NX-3 (a surface-active agent) for 24 h.

Fiber tenacity at break was measured according to the Polish standard PN-85/P-04761/04, using an Instron tensile testing machine.

Results

The objective of the work was to obtain precursor fibres with good strength properties, enabling the processing of the fibres into unwoven fabric, which will then undergo a process of carbonization. Conditions of forming were taken as in our previous work [...], making it possible to obtain precursor fibres with the increased porosity that is advantageous for the medical application of carbon fibres. The obtained precursor PAN fibres have a tenacity in the range 34–41 cN/tex, where the highest value of this parameter was obtained for fibres formed at a value of pull-out at the as-spun draw ratio of ~40%. These fibres also gave the highest value for total draw, at 912%.

The lowest specific tenacity value was obtained in the case of fibres whose total draw was 737%. In spite of the large differences in specific strength, the fibres obtained have similar elongation at brake, at a level of 10–11%. Both the specific strength and elongation at brake values are at levels which make it possible to process these fibres into unwoven fabric.

Tests of sorption properties show that all the types of fibres obtained have similar moisture sorption at 65% RH, amounting to around 2%, and moisture sorption at 100% RH, in the range of 6.3–7.4%.

TABLE 1. Properties of PAN fibres containing bioglass.

Sample symbol	As-spun draw ratio [%]	Total draw ratio [%]	Moisture sorption at 65% RH [%]	Moisture sorption at 100% RH [%]	Tenacity [cN/tex]	Elongation at brake [%]
P B1	10	817.48	2.20	6.45	37.83	11.48
P B1A	10	737.85	2.04	6.30	34.27	10.38
P B2	-40	912.58	2.04	7.39	41.02	11.81

Summary

The tests carried out demonstrated the possibility of obtaining PAN fibres containing bioglass with a tenacity of more than 30 cN/tex and elongation at brake of around 10%. Both of these parameter values are such as to allow the conclusion that the fibres obtained will offer good processability into unwoven fabric. The results of tests of the properties of the fabrics obtained, and of the process of their carbonization, will be the subject of subsequent work.

Research financed by the Minister of Science and Higher Education in 2010-2013 as project No. N508 487638.

References

- [1]. Hench, L.L. J Am Ceram Soc 74, 1991, 1487
- [2]. Hench, L.L. J Am Ceram Soc 81, 1998, 1705
- [3]. Yilmaz, S.; Efouglu, E.; Kilic, A.R. J Clin Periodontol 25, 1998, 832
- [4]. Yoshi, S.; Oka, M.; Yamamuro, T.; Ikeda, K.; Murakami, H. Acta Orthop Scand 71, 200, 580
- [5]. Yukna, R.A.; Evans, G.H.; Aichelman-Reidy, H.B.; Meyer, E.T. J Periodontol 72, 2001, 125
- [6]. I.Smitzis, Colloid Polym. Sci. 255, 1977, 948
- [7]. S.P.Papkow, Chim. Wołok. 4, 1981, 13
- [8]. T.Mikołajczyk, I.Krucińska, K.Kamecka-Jędrzejczak, Textile Res. J. 59, 1989, 557
- [9]. M.Boguń, T.Mikołajczyk, S.Rabiej Journal of Applied Polymer Science 114, 2009, 70
- [10]. M.Boguń, T.Mikołajczyk, G.Szparaga, A.Kurzak, M.Wójcik Fibres&Textiles East Eur. 5, 2008, 48
- [11]. T.Mikołajczyk, M.Boguń, M.Błazewicz, I.Piekarczyk J. Appl. Polym. Sci. 100, 2006, 2881

as orthopedic and dental implants.

Nevertheless, because of poor wear resistance, titanium materials are still facing clinical challenges such as implant loosening over time. The addition of graphite to lower the friction coefficient and increase wear resistance could produce a composite material that overcomes these disadvantages. Furthermore, the addition of graphite could improve the cell/material surface interaction and influence the cell capacity to proliferate and differentiate.

In our study the ability to promote cell proliferation and adhesion of titanium and titanium-grafit composite was compared by assessing the attachment of human normal osteoblasts in vitro.

Materials and methods

Materials

Specimens were fabricated by means of powder metallurgy method. Commercially available pure titanium in volume 80% and graphite in volume 20% were used as the component powders. The particle size of the pure titanium powder was below 150 μm , graphite powder had a mean particle size of 100 μm . Both components were mixed, cold compacted under pressure of 500 MPa and sintered for three hours in vacuum at the temperature of 1230°C.

Cell culture

The autoclaved titanium or titanium-graphite composite round compacts were placed in 48-well plates, one in each well. 1 ml of cell suspension containing 1.5×10^4 NHOst cells (Lonza, USA) was added on the surface of each specimen. Cells seeded on tissue culture plates (TCPS) at the same density, were used as positive controls. The biocompatibility of the sintered titanium-graphite composite was determined by the cytotoxicity studies (ToxiLight assay, Lonza, USA), adherence (crystal violet absorbance test) and proliferation rate (ViaLight assay, Lonza, USA) of cells seeded on materials. The morphology of the adherent cells was studied by fluorescence microscopy.

Results

Obtained results indicate that the presence of graphite have an impact on cellular adhesion, but not significantly on cellular proliferation. The cells seeded on the surfaces of the titanium-graphite composites have slightly lower proliferation, as compared to those cells seeded on the pure titanium and TCPS surfaces. However, it was observed that the human osteoblasts adhered well onto the surface of titanium-graphite compacts and exhibit proper phenotype (FIG.1).

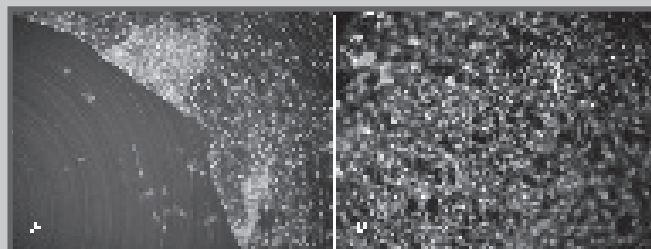


FIG.1 The cell adherence to titanium (A) and titanium-graphite composite (B). Cells well proliferated on the surface of titanium can be very easily detached from it. Micrographs obtained through fluorescence microscopy. Objective magnification 10x.

ENHANCED CELL INTEGRATION TO TITANIUM-GRAFIT COMPOSITE

ELŻBIETA MENASZEK^{1,2}, ANNA ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA³, PIOTR DEPTUŁA⁴, JAN R. DĄBROWSKI⁴

¹AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, 30 MICKIEWICZA ASVE., 30-059 CRACOW, POLAND

²JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM, DEPARTMENT OF CYTOBIOLOGY, 9 MEDYCZNA STR., 30-688 CRACOW, POLAND

³ACADEMY OF PHYSICAL EDUCATION, DEPARTMENT OF ANATOMY, 38 JANA PAWŁA II AVE., CRACOW, POLAND,

⁴BIALYSTOK UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, DEPARTMENT OF MATERIALS AND BIOMEDICAL ENGINEERING, 45C WIEJSKA STR., 15-351 BIALYSTOK, POLAND

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 122]

Introduction

Titanium based materials are widely used owing to desirable properties that include light weight, high strength and durability. Titanium based materials are also biocompatible, making them ideal for medical replacement structures such

TOMOGRAPHIC AND HISTOLOGICAL ASSESSMENT OF BONE REGENERATION IN THE EXPERIMENTAL DEFECTS IN RABBIT FEMORAL TROCHLEA TREATED WITH RESORBABLE SCAFFOLDS

E.PAMULA¹, E.MENASZEK^{1,2}, P.MALISZ³, P.DOBRZYNSKI⁴, M.ORZELSKI⁵, P.SILMANOWICZ⁵

¹AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS

30 MICKIEWICZA AVE., 30-059 CRACOW, POLAND

²JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM, DEPARTMENT OF CYTOBIOLOGY,

9 MEDYCZNA STR., 30-688 CRACOW, POLAND

³JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM, INSTITUTE OF STOMATOLOGY

4 MONTELUPICH STR., 31-155 CRACOW, POLAND

⁴POLISH ACADEMY OF SCIENCES,

CENTER OF POLYMER AND CARBON MATERIALS

34 M.CURIE-SKŁODOWSKIEJ STR., 41-819 ZABRZE, POLAND

⁵AGRICULTURAL UNIVERSITY, FACULTY OF VETERINARY MEDICINE,

DEPARTMENT AND CLINIC OF ANIMAL SURGERY

30 GLEBOKA ST., 20-612 LUBLIN, POLAND

MAILTO: EPAMULA@AGH.EDU.PL

[*Engineering of Biomaterials*, 99-101, (2010), 123-124]

Introduction

Nowadays a great attention is drawn to resorbable materials, for example copolymers of lactide and glycolide (PLG), as potential materials enhancing bone tissue regeneration [1]. It is related to the fact that one may control their biodegradation by changing lactide/glycolide ratio, chain microstructure, molecular mass, and crystallinity. PLG materials can be processed into scaffolds which mimic the structure of spongy bone, thus provide temporary matrix enhancing osteogenic cells adhesion, proliferation and differentiation. Moreover, the PLG scaffolds can be modified with hydroxyapatite (HAp), the most abundant mineral component in natural bone, in order to ensure better conditions to adhering cells and to promote the mineralisation of newly-formed tissue. Our previous experiments showed that the scaffolds produced from PLG materials support growth and differentiation of osteogenic cells in vitro [2,3].

This study aims at analyzing bone tissue regeneration in critical-size experimentally created bone defects in rabbits treated with different PLG scaffolds using computed tomography and histological technique.

Materials and methods

PLG 85:15 ($M_n=100$ kDa, $d=2.1$) was synthesized according to the method described previously [4]. Two types of cylindrical porous scaffolds (diameter 4 mm, height 5 mm) with porosity of 85% and size of the pores of 250-320 μ m and 400-600 μ m respectively, were obtained by a newly modified solvent casting/salt particulate leaching method [3]. The scaffolds were also modified with HAp by biomimetic SBF method [5]. The research protocol for the in

vivo study was approved by the local ethic committee. The scaffolds after being sterilized with oxygen peroxide plasma (Sterrad 120, ASP, J&J) were implanted into experimentally created critical-size osteochondral defects in New Zealand rabbit femoral trochlea. Four animals were used and each animal received three implants. The fourth defect was left empty. After 26 weeks from the surgery the animals were sacrificed, the femora containing implants were excised, placed in formalin and submitted to computed tomography (CT) examinations. The evaluations were done on GXCB-500/i-CAT (Gendex Dental System, Italy) tomograph at a voxel size of 200 μ m. The bone mineral density (expressed in Hounsfield units) was also evaluated from the image data for 15 μ m² areas. Afterwards, tissue blocks with implanted scaffolds and empty defect were excised, decalcified in buffered EDTA and embedded in Paraplast. Histological slices of 9 μ m in thickness were prepared and stained by Masson-Goldner method.

Results and discussion

FIG.1 shows representative CT images of tissue defects treated with three different types of scaffolds and that of empty defect. The images show that bone mineralization was more advanced in the defects filled with the scaffolds having the poresize of 250-320 μ m (FIG.1A) and those enriched with HAp (FIG.1B). On the other hand, defects filled with the scaffolds with bigger pores, e.g. 400-600 μ m in diameter (FIG.1C), and that of empty defect (FIG.1D) exhibited lower mineralization. The quantitative data of bone mineral density (BMD) for each defect and that measured for healthy spongy bone in rabbit femoral trochlea are presented in FIG.2. The results show that BMD tended to be the highest for the scaffolds having the pores in the range of 250-320 μ m enriched with HAp, while the lowest for the empty defect. Moreover, a tendency that the scaffolds with smaller pores elicited better bone mineralization than those with bigger pores of 400-600 μ m was found, although these results were not statistically different.

Histological pictures after Masson-Goldner staining of

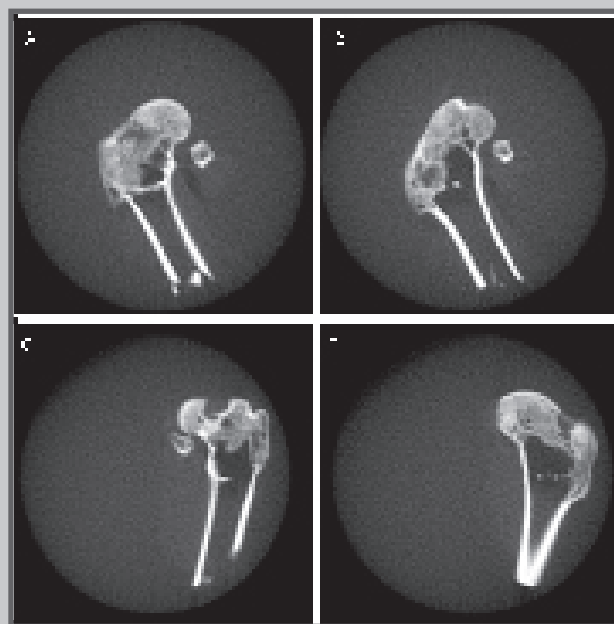


FIG.1. Computed tomography pictures of tissue defects in rabbit femoral trochlea after 26 weeks from surgery treated with scaffolds: A – poresize 250-320 μ m, B – poresize 250-320 μ m and HAp, C – poresize 400-600 μ m, and D – empty defect.

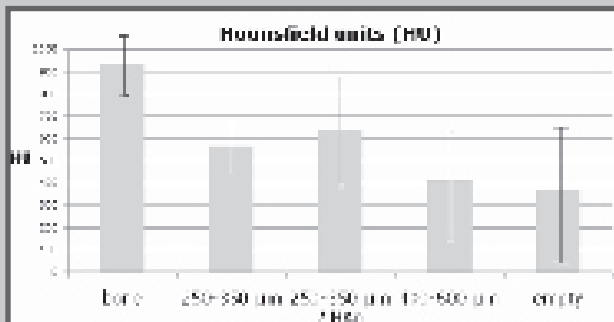


FIG.2. Bone mineral density in tissue defects in rabbit femoral trochlea after 26 weeks from surgery treated with scaffolds: A – poresize 250-320 µm, B – poresize 250-320 µm and HAp, C – poresize 400-600 µm, and D – empty defect; averages \pm standard deviation.

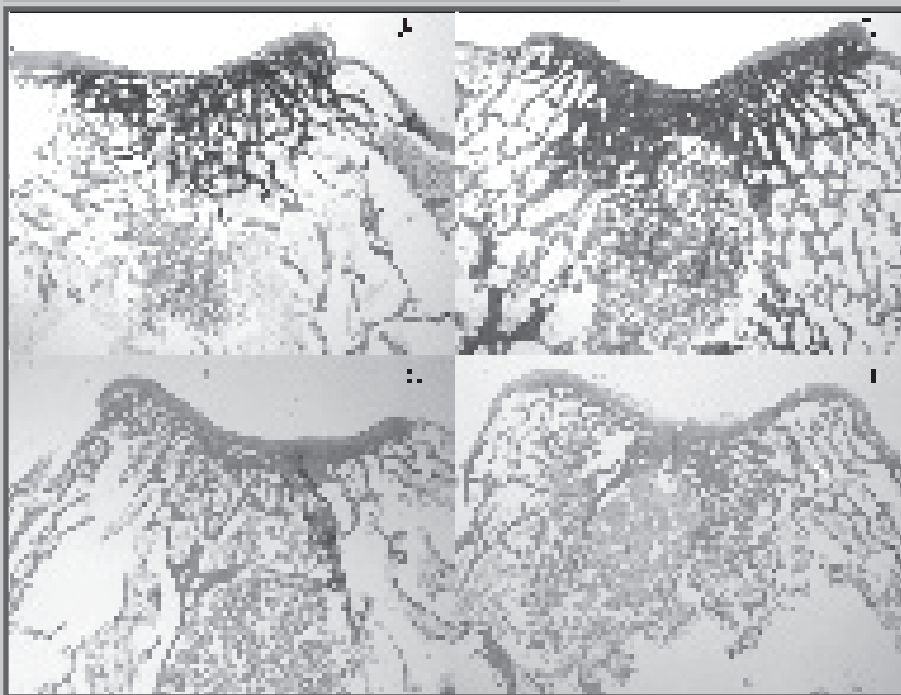


FIG.3. Histological pictures of tissue defects in rabbit femoral trochlea after 26 weeks from surgery treated with scaffolds: A – poresize 250-320 µm, B – poresize 250-320 µm and HAp, C – poresize 400-600 µm, and D – empty defect; Masson-Goldner staining, optical microscope Zeiss StereoDiscovery, original magnification 20x.

all examined materials and that of empty defect are presented in FIG.3. The results show that on the base of the implanted scaffolds newly formed bone trabeculae were observed. The remnants of the scaffold material were also visible in the implantation site. Bone regeneration was more advanced in the case of the scaffolds having the poresize of 250-320 µm (FIG.3A) and of 250-320 µm enriched with HAp (FIG.3B), than that of bigger pores, e.g. 400-600 µm in diameter (FIG.3C). It was also found that the defect reconstruction started from the peripheral bone ends and incorporated into the center of the scaffolds. In the case of empty defect the central part was filled with fibrous connective tissue (FIG.1D).

Our findings based on tomography and histological studies imply that in rabbit model the scaffolds with smaller pores better support bone regeneration and mineralization than those with bigger pores. It is contradictory to our previous findings received from in vitro studies of osteoblast-like cells in both static and dynamic conditions [3,6]. In those experiments the scaffolds with bigger pores (400-600 µm)

were the most appropriate for cell adhesion, proliferation and osteogenic differentiation. We attributed it to higher pore interconnectivity and scaffold permeability, thus assuring better diffusion of nutrients, wastes and/or material degradation products in the whole volume of the scaffold. In tissue defects it seems that these parameters characterizing the microstructure of the scaffolds are not the most crucial to support tissue regeneration. Probably relative surface area of the scaffolds, which is higher for the scaffolds with smaller pores than for those with bigger pores, better enhances osteogenic cells migration from the periphery into the center of the bone defect. As a result bone regeneration proceeds faster. Additional beneficial effect in bone mineralization was found if the scaffolds were modified with hydroxyapatite. This outcome is not surprising and it was already found in many previous studies [7].

To sum up, the results show that the scaffolds with pores in the range of 250-320 µm enriched with HAp have the highest potential for regeneration of critical size bone defects.

Acknowledgements

This study was financed from the Polish Budget Funds for Scientific Research within the years 2009-2012, as a research project No N507280736

References

- [1] Sabir M.I., Xu X., LiL., J Mat Sci: Mat Med 2009;44:5713-5724.
- [2] Pamula E, Bacakova L, Filova E, Buczyńska J, Dobrzyński P, Noskova L, Grausova L. J Mat Sci: Mat Med 2008;19:425-35.
- [3] Pamula E, Filova E, Bacakova L, Lisa V, Adamczyk D J Biomed Mater Res 2009;89A:432-443.
- [4] Dobrzyński P, Kasperczyk J, Janeczek H, Bero M. Macromolecules 2001;34 :5090-5098.
- [5] Douglas T, Pamula E, Hauk D, Wiltfang J, Sivananthan S, Sherry E, Warnke PH. J Mat Sci: Mat Med 2009;20:1909-1915.
- [6] Wojak I., Pamula E., Dobrzyński P., Zimmermann H., Worch H., Scharnweber D., Hintze V. Eng Biomat 86 (2009) 9-13.
- [7] Murphy W.L., Simmons C.A., Kaigler D., Mooney D.J., J Dent Res 2004;83,204-210.

KOMPOZYT POLIMEROWO-CERAMICZNY JAKO POTENCJALNY IMPLANT KOSTNY

AGNIESZKA JELONEK*, KATARZYNA KILAN,
AGNIESZKA SKÓRSKA-STANIA, BARBARA OLEKSYN

WYDZIAŁ CHEMII UNIwersYTETU Jagiellońskiego,
UL. INGARDENA 3, 30-060 KRAKÓW

*MAILTO: AGNIESZKA.HEFLICH@UJ.EDU.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 125-127]

Wraz z rozwojem medycyny wzrasta zapotrzebowanie na biomateriały mające za zadanie odbudowę i przywrócenie funkcjonalności uszkodzonych tkanek i organów. Jedną z dziedzin medycyny, która często wykorzystuje biomateriały do naprawy uszkodzonych tkanek jest, szeroko pojęta, chirurgia kostna. Duże znaczenie odgrywają w tym przypadku biomateriały ceramiczne, które mogą być wykorzystywane do leczenia ubytków kostnych. Materiałem ceramicznym stosowanym od lat w medycynie jest hydroksyapatyt. Jest to materiał bioaktywny, który może tworzyć chemiczne wiązanie z kością. Dodatkowo, porowaty hydroksyapatyt, może także ulegać biologicznemu wiązaniu z kością (kość przerasta implant). Hydroksyapatyt nie ulega resorpcji ani biodegradacji w środowisku biologicznym, jest nietoksyczny i nierakotwórczy, a jego skład chemiczny jest zbliżony do składu chemicznego kości. Niestety, jak każdy materiał ceramiczny, hydroksyapatyt jest kruchy i podatny na kruche pękanie. Charakteryzuje się także modulem Younga dużo wyższym od modułu Younga ludzkich kości. Poprawa właściwości mechanicznych materiałów hydroksyapatytowych może być zrealizowana poprzez tworzenie kompozytów np. ceramiczno-ceramicznych lub ceramiczno-polimerowych. Zaletą takich kompozytów jest możliwość zaprojektowania ich w taki sposób, aby posiadały wymagane właściwości mechaniczne, odpowiednią porowatość i niższy moduł Younga.

Szeroko stosowanym w medycynie polimerem jest nietoksyczny i nierakotwórczy polilaktid. Ulega on bioresorpcji w środowisku biologicznym. Główny produkt jego rozkładu, tj. kwas mlekowy, nie jest groźny dla człowieka, gdyż jest wytwarzany w organizmie ludzkim na skutek naturalnych procesów.

Dzięki połączeniu hydroksyapatytu i polilaktidu możliwe jest stworzenie kompozytu o odpowiednich właściwościach mechanicznych oraz dobrej poręczności chirurgicznej. Dodatkowo kompozyt polimerowo-ceramiczny może pełnić funkcję nośnika leków.

Celem tej pracy było stworzenie materiału do produkcji implantów kostnych konkurencyjnego w stosunku do materiałów dostępnych na rynku. Materiał ten docelowo powinien znaleźć zastosowanie w chirurgii twarzoczaszki, a co za tym idzie powinien być poręczny chirurgicznie i ulegać możliwie szybkiej integracji z kością. Ponadto mógłby potencjalnie spełniać rolę nośnika antybiotyku-klindamycyny.

Aby spełnić powyższe oczekiwania wstępnie skupiono się na otrzymaniu porowatych granul hydroksyapatytowych impregnowanych klindamycyną. Próby połączenia antybiotyku i ceramicznych granul nie przyniosły oczekiwanych rezultatów i konieczne są dalsze badania tego układu. Zdecydowano się więc na zastosowanie kompozytu polimerowo-ceramicznego. Wybranymi materiałami do stworzenia kompozytu o wspomnianych właściwościach był syntetyczny hydroksyapatyt i poli(D,L-laktid). Kompozyt miał postać porowatych granul hydroksyapatytowych pokrywanych

POLYMER-CERAMIC COMPOSITE AS A POTENTIAL BONE IMPLANT

AGNIESZKA JELONEK*, KATARZYNA KILAN,
AGNIESZKA SKÓRSKA-STANIA, BARBARA OLEKSYN

FACULTY OF CHEMISTRY, JAGIELLONIAN UNIVERSITY, UL. INGARDENA 3, 30-060 KRAKÓW

*MAILTO: AGNIESZKA.HEFLICH@UJ.EDU.PL

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 125-127]

For the last few years we can observe a progress in medicine and an increasing requirements for biomaterials which can help in reconstruction and restoring the functionality of damaged tissues and organs. An osteosurgery is one of the branches of medical science that often use biomaterials to repair damaged tissues. Bioceramics plays a significant role in healing bone defects. Hydroxyapatite is a bioceramic material which is used for many years in medicine. It is bioactive and able to create a chemical bond with bone. Moreover, in its porous form, it can bind to bone in biological way (bone grown into the implant). Hydroxyapatite does not resorb or biodegrade in biological environment. It is non-toxic and non-cancerogenic. Chemical composition of hydroxyapatite is similar to human bone. Unfortunately, it is brittle and has low fracture toughness. Young modulus of hydroxyapatite is much higher than Young modulus of human bone. To improve mechanical properties of hydroxyapatite materials we can create composite materials such as a ceramic-ceramic composite or a polymer-ceramic composite. The great advantage of composite materials is the fact that it is possible to tailor their properties to different requirements.

A polymer which is extensively used in medicine is polylactide. It is non-toxic and non-cancerogenic. In biological environment polylactide is resorbed in controlled way. The main product of its decomposition is lactic acid. It is harmless for human because it is formed in our bodies during natural process.

It is possible to create a composite that has good mechanical properties and is surgically convenient. Additionally it is possible to use a polymer-ceramic composite as a drug carrier.

The purpose of this work was to create a bone implant material that could be competitive to already used materials. Our material could be applied in oral and maxillofacial surgery. This material is required to be surgically convenient and binds to bone in short time after implantation. Potentially it also can be used as a drug carrier for clindamycin.

At first, to perform all requirements, porous hydroxyapatite granules impregnated with clindamycin were obtained. All efforts to connect directly clindamycin and ceramic granules did not bring expected effects and further research is necessary. That is why we created a polymer-ceramic composite. Materials that were used in this work were hydroxyapatite and poly(D,L-lactide). The composite was porous hydroxyapatite granules covered with poly(D,L-lactide). The function of polymer was to increase adhesion and to improve surgical convenience of the implant. Additionally it should allow to incorporate clindamycin into the system. Poly(D,L-lactide) was synthesized in The Centre of Polymer and Carbon Materials of Polish Academy of Sciences in Zabrze. Its molecular weight was 80 kDa.

Synthetic hydroxyapatite was obtained using wet precipitation method. The porous granules were produced by using a method based on liquids immiscibility effect [1]. A

poli(D,L-laktydem). Polimer miał za zadanie zwiększyć adhezję i poprawić poręczność chirurgiczną implantu oraz zapewnić inkorporację klindamycyny do układu. Wykorzystany poli(D,L-laktyd) zsyntetyzowany został w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych Polskiej Akademii Nauk w Zabrze. Jego masa cząsteczkowa wynosiła około 80 kDa.

Czysty fazowo syntetyczny hydroksyapatyt otrzymano metodą strącaniową. Wykorzystano go do sporządzenia porowatych granul metodą niemieszających się płynów [1]. Do wodnego roztworu żelatyny dodano odpowiednią ilość proszku hydroksyapatytowego. Powstałą zawiesinę wkropiono do schłodzonego oleju, całość mieszano na mieszadle magnetycznym. Na skutek działania sił napięcia powierzchniowego utworzyły się granule, które następnie wypłukano i wysuszone. Wysuszone granule poddano wygrzewaniu w celu wypalenia żelatyny oraz spieczono. Granule hydroksyapatytowe zaprojektowano tak aby mogły być wykorzystywane w leczeniu głębokich kieszonek kostnych, do powiększania zanikłej krawędzi wyrostka zębodołowego, do uzupełniania ubytków kostnych po zabiegach hemisekcji, radektomii, amputacji korzenia zęba lub po operacji cyst korzeniowych oraz do wypełnień niewielkich ubytków kostnych po usuniętych torbielach i guzach lub powstałych na skutek urazów. Granule pokrywane były polimerem. W tym celu odpowiednią ilość poli(D,L-laktydu) rozpuszczono w rozpuszczalniku i dodano granule. Całość mieszano na mieszadle magnetycznym na wysokich obrotach przez kilka minut. Następnie granule suszono na polimerowym podłożu w atmosferze powietrza.

Analiza otrzymanych granul za pomocą metody mikroskopii elektronowej (SEM) wykazała, że ich rozmiar waha się w przedziale od około 200 do 900 μm . Taki rozmiar granul powinien gwarantować zarówno możliwość ich zastosowania do uzupełniania nawet niewielkich ubytków kostnych, jak i dobrą poręczność chirurgiczną (możliwość aplikacji przez strzykawkę). Granule były porowate aby umożliwić kości przerastanie implantu [2,3,4] oraz ułatwić uwalnianie się klindamycyny. Otrzymano trzy serie granul o zaprojektowanej porowatości: pierwsza seria miała zostać zaimpregnowana lekiem zaś dwie następne miały być jedną z faz kompozytu. Porowatość wszystkich granul zbadano metodą hydrostatyczną i wynosiła ona odpowiednio: około 25% oraz 25% i 40%.

Aby zaimpregnować porowate granule klindamycyną przygotowano porcję granul o określonej objętości. Następnie umieszczono je we wcześniej przygotowanym wodnym roztworze klindamycyny, intensywnie wymieszano i pozostawiono do wyschnięcia w atmosferze powietrza.

W celu wytworzenia kompozytu granule pokrywano warstwą poli(D,L-laktydu)-amorficznego polimeru o niewielkiej masie cząsteczkowej, a co za tym idzie o niewysokiej wytrzymałości mechanicznej oraz stosunkowo krótkim czasie degradacji. Warstwa stanowiła odpowiednio 20% i 40% wagowych granul. Przy użyciu metody mikroanalizy rentgenowskiej potwierdzono obecność pokrycia polimerowego. Zbadano degradację polimeru w PBS w temperaturze około 37-40°C po 10 dniach. Ubytek masy odpowiednio dla danej serii granul wynosił około 15% i 18% wagowych polimeru.

Ważnym atutem implantu polilaktydowo-hydroksyapatytowego w postaci niewielkich granul jest możliwość mieszania go z klejem kostnym lub krwią i aplikacji przez strzykawkę, co dodatkowo zwiększa jego adhezję do ścian ubytku oraz poprawia poręczność chirurgiczną.

W przypadku granul hydroksyapatytowych, które były impregnowane klindamycyną (bez dodatku polimeru) przeprowadzono badania mające na celu charakterystykę układu. Ustalono, że klindamycyna nie jest związkiem, którego wodne roztwory można efektywnie badać za pomocą

hydroksyapatite powder was added to aqueous solution of gelatin. Vegetable oil was cooled and a hydroxyapatite-gelatin suspension was dropped in. Mixture of this immiscible liquids was stirred on magnetic stirrer. Granules were formed due to the surface tension forces. Obtained granules were washed and dried. Afterwards, dry granules were heated due to burn of gelatine and sintered. Granules were designed to healing periodontal pockets, alveolar bone, to fill bone defects after: hemisection, radectomy, amputation the root of a tooth or root cyst and tumor surgery and also the defects formed after injuries.

Granules were covered with polymer. Poly(D,L-lactide) was dissolved and granules were added. It was stirred on magnetic stirrer for few minutes. Afterwards granules were dried on polymer base in air atmosphere.

The SEM analysis of granules showed that their dimensions range from 200 to 900 μm . Granules of such dimensions should be appropriate to fill in even small bone defects and they should be surgically convenient (the possibility of injection by syringe).

To enable bone growth into implant the porous granules were designed [2,3,4]. Pores also facilitate the release of clindamycin. Three series of granules with designed porosity were produced: first one impregnated with clindamycin and two others that would be used as one of the phases of composite. Porosity of all series were examined using hydrostatic method and it was about 25%, 25% and 40%, respectively.

A portion of porous granules was prepared to impregnate it with clindamycin. Afterwards, the aqueous solution of clindamycin was prepared and the portion of granules was placed into it. Everything was mixed vigorously and left to dry in the air atmosphere.

Two other series of granules (25% and 40% porosity) were covered with poly(D,L-lactide). Poly(D,L-lactide) is an amorphous polymer with low molecular weight and low mechanical properties as well as relatively short time of degradation. The mass of the polymer layer in both mentioned series was about 20% and 40% of the total granules weight, respectively. The presence of polymer layer was confirmed by X-ray microanalysis. The degradation of polylactide was investigated in PBS at 37-40°C after 10 days of immersion. The mass loss for each granules series was 15% and 18%, respectively.

The important advantage of polylactide-hydroxyapatite implant in the form of small granules is the possibility of mixing it with bone glue or blood and injection by syringe which additionally improve adhesion and surgical convenience.

In the case of hydroxyapatite granules, which were impregnated with clindamycin (without polymer layer), the investigation of the system was carried out. It was shown that clindamycin is the compound the aqueous solutions of which can not be effectively investigated by UV-VIS spectroscopy [5]. Further investigations were focused on finding an experimental method to examine hydroxyapatite-clindamycin system. Raman spectroscopy methods were performed. Unfortunately, the Raman scattering cross-section of hydroxyapatite was much higher than that of clindamycin. The system was also characterised by IR spectroscopy method. However, the results were ambiguous.

In conclusion, the system: hydroxyapatite granules-clindamycin was difficult to describe and investigate, so the further examination is required.

In the case of polymer-hydroxyapatite composite - a potential bone implant, it was established that it is possible to obtain this material in form of porous hydroxyapatite granules covered with polylactide. The great advantage of these system is the possibility of modification the granule size,

spektroskopii UV-VIS [5]. Dalsze badania ograniczyły się do znalezienia metody doświadczalnej zbadania układu hydroksyapatyt-klindamycyna. Sprawdzono użyteczność metod spektroskopii ramanowskiej, niestety niekorzystny stosunek przekrojów czynnych na rozpraszanie Ramana klindamycyny w stosunku do hydroksyapatytu uniemożliwił wykorzystanie tej metody. Układ próbowano charakteryzować również metodą spektroskopii w podczerwieni, niestety otrzymane wyniki były niejednoznaczne.

Podsumowując wyniki tej pracy można stwierdzić, że charakterystyka układu: porowate granule hydroksyapatytowe - klindamycyna nie daje jednoznacznych wyników i układ powinien być dokładniej zbadany. W przypadku kompozytu ceramiczno – polimerowego, mającego służyć jako implant kostny, okazało się, że możliwe jest otrzymanie takiego materiału w formie porowatych granul hydroksyapatytowych pokrywanych polilaktydem. Zaletą takiego układu jest możliwość modyfikacji wielkości granul, ich porowatości oraz grubości pokrycia polimerowego. Kompozyt ten, po inkorporacji klindamycyny do polimeru, mógłby służyć jako nośnik leku.

porosity and thickness of polymer layer. After incorporation of clindamycin into polymer this composite material could be used as a drug carrier.

Piśmiennictwo

References

- [1] Komlev, V.S., Barinov S.M., Koplik E.V.: A method to fabricate porous spherical hydroxyapatite granules intended for time controlled drug release. *Biomaterials* 2002 23 s.3449 – 3454
- [2] Ślósarczyk A. Biomateriały ceramiczne.[W:] *Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna 2000. Tom 4. Biomateriały*. Redaktorzy tom: Błażewicz S., Stoch L. Warszawa: Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, 2003 s.99-149. Redaktor serii: Maciej Nałęcz
- [3] Sopyan I., Melb M., Ramesh S., Khalid K.A.: Porous hydroxyapatite for artificial bone applications. *Science and Technology of Advanced Materials* 2007 8 s.116-123
- [4] Orlovski V.P., Komlev V.S., Barinov S.M.: Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-Based Ceramics. *Inorganic Materials* 2002 vol. 38 nr 10, 2002 s.973-984
- [5] Amin A.S. Spectrophotometric and conductometric determination of clindamycin hydrochloride in pure form and pharmaceutical preparations, *Analisis* 1995 23 s.415-417

VIBRATIONAL SPECTROSCOPY INVESTIGATION OF MONTMORILLONITE - CHITOSANE NANOCOMPOSITE MATERIALS

C. PALUSZKIEWICZ, E. STODOLAK

AGH – UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
30 MICKIEWICZA AVE., 30-059 CRACOW, POLAND

Abstract

Biomaterials basing on natural polysaccharides, i.e. hiauronic acid, alginate, chitosane are an alternative for already applied bioresorbable synthetic materials basing on synthetic polyhydroxyacids. Their main advantages are good accessibility, low cost, easy forming and high biocompatibility. Additionally, they are a perfect matrix for bioactive nanoparticles i.e. hydroxyapatite (HAp), tricalcium phosphate (TCP) and silica (SiO₂).

The work presents results of research on nanocomposite consisting of chitosane matrix (CS) modified with a nanofiller, which was natural montmorillonite (MMT). Nanocomposite foils were produced by the casting method. In order to induce better biocompatibility, the surface of the CS/MMT composite was neutralized (bath in NaOH solution). The nanocomposite foils were subjected to a bioactivity test by incubation in SBF at 37°C for 7 days. It was observed that the CS/MMT material surface showed a local supersaturation, which was a result of apatite nucleation. The CS/MMT nanocomposites were investigated using FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) and Fourier Raman Spectroscopy.

FTIR measurements of the samples were carried out on the transmission and reflection modes. The FTIR microscopy spectra were collected using Bio-Rad Excalibur with ATR attachment as well as microscope UMA500 equipped with MCT detector. Spectra were measured at 4 cm⁻¹ resolution in the region from 4000 cm⁻¹ to 600 cm⁻¹. FT-Raman spectra were obtained using a FTS6000 Bio-Rad spectrometer with Ge detector. The samples were excited with a Nd-YAG laser (1064nm). Additional all materials in all steps experiments were observed under Scanning Electron Microscopy (Nova NanoSEM).

Vibrational spectroscopy methods (FT Raman and FTIR) can be used for investigation of nanocomposite foils basing on biopolymers. High sensitivity the applied spectroscopy techniques show that in the result of the neutralization of CS/MMT foil (via incubation in NaOH solution) the biopolymer chain breaks. This phenomena is visible by intensity ratio between COC/COH bands. Increase of reactivity of chitosane chain lead to entrapment of PO₄³⁻, which is the origin of the apatite forms nucleation process.

Chemical treatment of the nanocomposite foils, i.e. NaOH washes influences their chemical structure and microstructure. Neutralisation of the foils is the first processing stage which precedes the potential use of CS/MMT foils in biomedical applications. The materials show a tendency to apatite crystallisation which may support regeneration of damaged bone tissue.

The applied spectroscopic methods allowed to observe changes in the whole volume of the sample.

Individual ATR measurements taken at various spectral ranges and penetration depths allow to observe subtle changes in the polymer matrix caused by chemical treatment (NaOH and SBF incubation). Results of the investigations indicate that in the CS/MMT systems new chemical bonds and related to them vibrations appear. Quantity and quality of the interactions is related to characteristics of the nanoparticle and the presence of forming apatite structures.

[*Engineering of Biomaterials*, 99-101, (2010), 128]

Acknowledgements

This work was supported by The Ministry of Science and Higher Education, grant No. N N507 370735